



Università degli Studi di Genova

Dipartimento di Scienze della terra, dell'ambiente e della vita (DISTAV)

Corso di Dottorato in SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AMBIENTE E IL TERRITORIO (STAT)

Curriculum: Biologia applicata all'agricoltura e all'ambiente
XXXII ciclo

Dottoranda: *Dott.ssa Elena Nicosia.*

Tutor: *Prof. Mauro Mariotti.*

Co-tutor: *Dott.ssa Enrica Roccotiello*

Tesi di dottorato / PhD Thesis

**“TOLLERANZA E ACCUMULO DI NICHEL IN CULTIVAR DI POMODORO:
POTENZIALE ALLERGENICITÀ DI PIANTE NI-FREE, PRATICHE
AGRONOMICHE”**

**“NICKEL TOLERANCE AND STORAGE IN TOMATO CULTIVARS:
POTENTIAL ALLERGENICITY OF NI-FREE PLANTS, AGRONOMIC
PRACTICES”**

Indice

ABSTRACT AND AIMS	4
INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO	8
1.1 Il pomodoro: importanza economica e nutrizionale	12
1.2 La produzione di pomodoro nel mondo	14
1.3 Impatto della produzione di pomodoro nella catena agroalimentare, dai produttori ai consumatori	15
2. IL NICHEL	18
2.1 Il Nichel nell'ambiente	18
2.2 Importanza e potenziale tossicità del Nichel nelle piante	21
2.3 Il Nichel negli alimenti	22
3. ALLERGIA AL POMODORO	24
3.1 Allergia al Nichel	24
3.2 Proteine allergeniche	26
3.3. Dati epidemiologici	29
4. OBIETTIVI E FASI DELLA RICERCA	31
5. MATERIALI E METODI	32
5.1 Scelta delle cultivar di pomodoro	32
5.2 Resistenza del pomodoro al Nichel: test in microcosmo	32
5.2.1 Standard internazionali e requisiti per lo svolgimento del test	33
5.2.2. Specie test	33
5.2.3 Sterilizzazione e imbibizione	33
5.2.4 Preparazione delle soluzioni da testare	34
5.2.5 Allestimento del test	34
5.2.6 Parametri registrati	34
5.3. L'impatto del Ni sulla produzione di biomassa e sulla fruttificazione: test in mesocosmo	35
5.3.1 Preparazione del test e disegno sperimentale	35
5.3.2 La coltivazione delle piante	37
5.3.3 Registrazione della fruttificazione	38
5.3.4 Registrazione delle biomasse	38
5.4. Colture di pomodoro Ni-free fuori suolo presso un'azienda agricola	38
5.5 Metodologia di determinazione del nichel nei pomodori e nei suoli	39
5.5.1. Analisi elementare mediante spettrofotometria EDXRF	40

5.5.2 Analisi elementare di controllo mediante ICP-MS	40
5.6. Determinazione delle proteine allergeniche nei frutti di pomodoro.....	40
5.6.1. Preparazione di estratti proteici e frazioni separate	40
5.6.3. Sequenziamento aminoacidico.	41
5.6.4. Gli esperimenti di inibizione dell'IgE con il sistema di test FABER®	41
5.6.5. Test sierologici	42
5.7. Analisi statistica	43
6. RISULTATI.....	45
6.1 Test in microcosmo sulla resistenza del pomodoro al Nichel.....	45
6.2 Impatto sulla produzione di biomassa e sulla fruttificazione in coltivazione di pomodoro in mesocosmo su suoli a diverse concentrazioni di nichel	45
6.2.1 Concentrazione del nichel nei suoli	46
6.2.2. Fruttificazione	47
6.2.3 Produzione di biomassa dei frutti.....	48
6.2.4 Produzione di biomassa vegetale e accumulo di nichel in frutti di pomodoro ...	49
6.4 Accumulo di Nichel in frutti di pomodoro coltivato fuori suolo in azienda	54
6.5 Contenuto di proteine allergeniche nei pomodori a diverso contenuto di Ni	58
6.5.1 Estratti proteici.	58
6.5.2 Analisi del contenuto di LTP (lipid transfer protein) e TLP (Thaumatococcus proteins) nelle frazioni di proteine di pomodoro delle molecole di base	59
6.6 Risposte anticorpali di sieri di pazienti allergici al pomodoro alla somministrazione di pomodori a basso contenuto di Ni	62
6.6.1 Analisi del contenuto di allergeni nei campioni di pomodoro da test di inibizione delle IgE.....	62
7. DISCUSSIONE	64
9. BIBLIOGRAFIA.....	72

ABSTRACT AND AIMS

The theme of food allergies and intolerances in recent decades raised a constant awareness, related to the increase of prevalence in the general population and the increasing severity of clinical manifestations, resulting in more frequent access to emergency healthcare facilities. Fruit and vegetables often cause food allergies. In addition, a geographical difference in public awareness on different allergens has already been recorded, probably linked to different diets and occurrence of allergenic forms of plant taxa, due to environmental and genetic factors.

Nickel (Ni) is an essential micronutrient for some living organisms and is a key component for the functioning of the enzyme urease (Dixon *et al.*, 1975), found in bacteria, plants and animals.

Tomato, *Solanum lycopersicum* L., is one of the main diet constituents worldwide. The daily ingestion of tomato can significantly differ depending on the geographical area (e.g. 5.9 g/day in the Netherlands, 47.5 g /day in Germany and 112.5 g /day in Greece) (Jenab *et al.*, 2005). The occurrence of tomato allergy ranges from 1.5% in northern Europe (Petersen *et al.*, 1996) to 16% in Italy (Ortolani *et al.*, 1996) among the allergic population. Tomato allergy seems to be linked to some Lipid Transfer Protein or LTP (Lyc and 3LTP) but, very often alongside what may be a protein-reactive IgE allergy, there is a reactivity linked to the presence of Ni in the fruit. Although tomato is not one of the foods with the highest concentration of Ni (0.09 mg/kg; Pingitore, 2014), it represents a widely used food, the consumption of which has increased considerably in the last 20 years (Pravettoni *et al.*, 2009).

The allergy to Ni can result in allergic contact dermatitis (Dac) or through another pathological form defined as Systemic Nickel Allergy Syndrome (SNAS), syndrome. SNAS is characterized by generalized disorders of organs and apparatuses, affecting the gastrointestinal system (vomiting, diarrhea or constipation, abdominal swelling), the respiratory system (asthma or rhinitis), the neurological system (headaches or neuroasthenic disorders). The therapeutic approach is mainly dietary, although there is the possibility of desensitizing therapy. Food ingestion and water consumption are the main sources of exposure to Ni in the population. Individuals with SNAS must exclude tomato from their diet, resulting in a decreased life quality.

The concentration of Ni in plants depends on several factors: first, the availability of the element in the soil, in turn linked to the type of mother rock and pedogenesis. The concentration of Ni in natural soils is 10-1000 mg/kg while in polluted soils it can range from 200 to 26000 mg/kg, 20-30 times higher than the range found in soils in undisturbed conditions (Coman *et al.*, 2013). Agricultural lands usually have 3 to 1000 mg/kg Ni but can reach 2000-6000 mg/kg Ni if derived from basic igneous rocks. The soils derived from ultramafic rocks show the highest Ni

concentration (Sacchi ,*et al.*, 2007). Nevertheless, the current availability of Ni for plants also depends on different conditions such as pH, temperature, concentration of other ions, etc.

However, the tomato genotype, seasonality and culture practices also lead to conditions of high variability. In addition, this variability could also be affected by the symbiosis between the root system, bacteria and/or mycorrhizal fungi (Ouziad ,*et al.*, 2005). The complexity of the problem is evidenced by the fact that plants grown on the same soil can show extremely different level of Ni, whose normal concentration at the leaf level is 0.2–5 mg/kg (Reeves, 1992). High amounts of Ni in the soil can cause variable phytotoxicity symptoms depending on the availability of the element and the plant species examined (Mizuno, 1968; Khalid and Tinsley, 1980). For all the above-mentioned factors, it is very difficult to find Ni-free plants in nature, but it can be possible trying to reduce the Ni content in tomato through appropriate agronomic practices.

While experiences on other hypoallergenic foods are well developed (for example, gluten-free cereal products or lactose-free dairy products), specific knowledge for low-Ni hypoallergenic products is almost absent. There is still a lack of agricultural practices to limit Ni absorption and reduce the input and costs of pesticides and fertilizers, while improving the nutritional value of fruit. In most cases, tomato genotypes were, in fact, analyzed from an agronomic and technological point of view, according to the nutritional benefits of the presence of lycopene in the fruit, without considering the production of allergenic proteins (for example, LTP) and Ni content that could increase the risk of allergies. Currently, there are no guidelines for the hypoallergenic tomato food chain. A new approach could provide high-value tomato production for growers and consumers.

The final target of the research project was therefore to assess the crop conditions suitable for the production of tomato containing a low amount of Ni (0.25 and 0.40 mg/kg of dry substance), in comparison to the metal concentrations related to fresh tomato and commonly estimated at more than 1 mg/kg of food depending on the physical-chemical characteristics of agricultural soils and crop practices, also in relation to fertilizers and agrochemicals used.

Once the most appropriate methodologies for making the tomato crop Ni-free were highlighted, its allergenic potential was also assessed according to the content of allergenic proteins present, through experimental *in vitro* techniques.

Among plant allergens, LTPs are small proteins with high stability, ubiquitous in plant tissues (Radauer ,*et al.*, 2008). The family of plant LTPs includes two subfamilies, 9k-LTP and 7k-LTP, in relation to molecular mass, 9 kDa and 7 kDa, respectively, (Giangrieco ,*et al.*, 2015). Their ingestion, inhalation and contact can cause even very severe allergic reactions ranging from oral allergic syndrome (OAS), gastroenteric involvement, angioedema and anaphylactic shock, (Fernandez-Rivas ,*et al.*, 2006; Romano ,*et al.*, 2012).

To date, several tomato allergens have been identified and recorded by the WHO/IUIS (International Union of Immunological Societies) nomenclature, including a 7k-LTP (LTP 6) and several isoforms of 9k-LTP (Sola l 3). The list of tomato allergens also includes Sola l 1, a 14 kDa profile, Sola l 2, a 50 kDa betafructofuranosidase; Sola l 4, an intracellular protein related to pathogenesis TSI-1 (Inappropriate Sinusa Tachicardia) of the Bet v 1 family (Welter *et al.*, 2013), Sola l 5, a cyclophyline. Additional allergens, or putative allergens, not yet included in the WHO-IUIS nomenclature, such as 11 Globin S, ribosome protein P2, chitinase, glucanase, peroxidase, polygalacturonase, taumatococin and vicilline have been reported and inserted into the Allergome database (www.allergome.org).

To date, the possible association between the presence of allergenic proteins and the content of Ni in tomato had never been investigated. Given the significant tomato consumption in Europe over the last 20 years (for example, Greece with 104 kg/per capita, Italy with 55 kg/per capita, Denmark with 30 kg/per capita), the health risks arising from the high intake of Ni need to be assessed. In addition, at present about 17% of European citizens exclude tomato-containing products from the diet due to related allergies (Uter *et al.*, 2016).

The objectives of the research were: 1) to identify tomato genotypes, commonly used in Liguria, NW-Italy, with the lowest accumulation of Ni in the fruit; 2) to identify the conditions for cultivation that limit the metal uptake in plant; 3) to assess the allergenic potential of the resulting fruits.

The thesis is divided in seven parts and it is organized as follows. Chapter 1 of the thesis described the economic and nutritional importance of tomato and its production context in Liguria, NW-Italy, identifying the cultivars of major interest. Chapter 2 explored the role and presence of Nickel in the environment, plants and food and its standards when present. Chapter 3 included the various known aspects of tomato allergy, SNAS syndrome, tomato allergenic proteins and known European and national epidemiological data on these syndromes. Chapter 4 described the objectives and stages of the research, while Chapter 5 describes the methodologies adopted in the various experimental phases:

- 1) Testing of the effect of exogenous Ni on tomato in microcosm and evaluating Ni effects on tomato seed germination and early stages of development on the different cultivars chosen;
- 2) Evaluating the effects of Ni addition in the growing substrate on the different tomato cultivars, in mesocosm and controlled environment, in terms of biomass and fructification and accumulation in plants and fruits
- 3) Testing on-farm Ni-free soilless agricultural practices and evaluating the Ni content in fruits

- 4) Determining and assessing the allergenic potential of tomato fruits as above obtained in experimental phases 2) and 3) through the determination of the content of allergenic proteins and reactivity tests of serums of patients allergic to tomato in contact with the extracts of tomato fruits obtained from experimental phases 2) and 3).

In Chapter 6, the results were presented. They showed a significant correlation between the quantities of Nickel added to the growing substrate and Ni found in fruits. About the content of allergenic proteins in tomato fruits, and the antibody response of allergic patients' sera the results were rather highly variable and do not show direct correlation between allergenic proteins and Ni content in fruit, apart from profilin respect to increasing Ni levels. Main findings were discussed in Chapter 7.

It is concluded that although the correlations with allergenic proteins need further investigation, as regards the prevention of SNAS syndrome, dependent on contact with Ni, the Ni-free tomato represents an important opportunity to start a highly valuable production dedicated to allergic people and could be a product of primary importance for the Italian economy.

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

Il tema delle allergie e intolleranze alimentari vede in questi ultimi decenni un costante aumento di attenzione, correlato al reale incremento di prevalenza nella popolazione generale ed alla crescente gravità delle manifestazioni cliniche, sempre più spesso causa di accesso alle strutture sanitarie in regime di urgenza. La frutta e gli ortaggi sono frequentemente causa di allergie alimentari e una differenza geografica nella sensibilizzazione della popolazione ai diversi allergeni è già stata registrata ed è probabilmente legata ai diversi regimi alimentari nonché alla diversa presenza nei *taxa* vegetali dei fattori allergizzanti dovuta anche a fattori ambientali e genetici della popolazione.

Il Nichel (Ni) è un micronutriente essenziale per alcuni organismi viventi ed è un componente fondamentale per il funzionamento dell'enzima ureasi (Dixon *et al.*, 1975), presente in batteri, piante e animali.

Il pomodoro, *Solanum lycopersicum* L., è uno dei principali costituenti della dieta in tutto il mondo. L'ingestione giornaliera di pomodoro può differire in maniera significativa a seconda dell'area geografica (es. 5.9 g /giorno in Olanda, 47,5 g /giorno in Germania e 112.5 g /giorno in Grecia) (Jenab *et al.*, 2005). La maggior presenza di allergia al pomodoro va dall'1,5% del nord Europa (Petersen *et al.*, 1996) al 16% dell'Italia (Ortolani *et al.*, 1996) fra la popolazione allergica. L'allergia al pomodoro pare sia legata ad alcune Lipid Transfer Protein o LTP (Lyc e 3LTP) ma, molto spesso accanto a quella che può essere una allergia IgE reattiva alle proteine, vi è una reattività legata alla presenza di Ni nel frutto. Sebbene il pomodoro non sia uno degli alimenti a maggior concentrazione di Ni (0,09 mg/kg; Pingitore, 2014) esso rappresenta un alimento largamente utilizzato, il cui consumo è notevolmente aumentato negli ultimi 20 anni (Pravettoni *et al.*, 2009).

Con particolare riferimento alla ricerca in oggetto, l'allergia al Ni si può manifestare come dermatite allergica da contatto (Dac) o attraverso un'altra forma patologica definita come Sindrome Sistemica da Allergia al Nichel (SNAS), sindrome in forte progressione epidemiologica. La SNAS è caratterizzata da disturbi generalizzati a carico di organi e apparati, che interessano il sistema gastrointestinale (vomito, diarrea o stipsi, gonfiore addominale), il sistema respiratorio (asma o rinite), il sistema neurologico (cefalee o disturbi neuroastenici). L'approccio terapeutico è principalmente dietetico, anche se esiste la possibilità di una terapia desensibilizzante. L'ingestione di cibo e il consumo di acqua rappresentano la principale fonte di esposizione al Ni nella popolazione. Gli individui affetti da SNAS escludono il pomodoro dalla propria dieta, con conseguente diminuzione della qualità di vita.

La concentrazione di Ni nelle piante dipende da molti fattori, *in primis* dalla disponibilità dell'elemento nel suolo, a sua volta legata al tipo di roccia madre e alla pedogenesi. La concentrazione del Ni nei suoli naturali è di 10-1000 mg/kg mentre nei suoli inquinati può variare dai 200 ai 26000 mg/kg, 20-30 volte più elevata del *range* che si ritrova nei suoli in condizioni inalterate (Coman *et al.*, 2013). I terreni agricoli presentano normalmente da 3 a 1000 mg/kg Ni, ma anche 2000-6000 mg/kg Ni qualora derivanti da rocce ignee basiche. I terreni derivanti da ultramafiti presentano la maggiore concentrazione di Ni (Sacchi *et al.*, 2007), tuttavia l'effettiva disponibilità del Ni per le piante dipende anche da altre condizioni quali pH, temperatura, concentrazione di altri ioni, ecc.

Inoltre, anche il genotipo del pomodoro, la stagionalità e le pratiche colturali determinano condizioni di forte variabilità. Tale variabilità potrebbe anche essere influenzata dalla simbiosi, a livello dell'apparato radicale, tra la pianta, i batteri e/o i funghi micorrizici (Ouziad *et al.*, 2005). La complessità del problema è testimoniata dal fatto che piante cresciute sullo stesso terreno possono mostrare livelli estremamente differenti di Ni, la cui normale concentrazione a livello fogliare è di 0,2-5 mg/kg (Reeves, 1992). Quantità elevate di Ni nel suolo possono causare fitotossicità variabile a seconda della disponibilità dell'elemento e delle specie vegetali prese in esame (Mizuno, 1968; Khalid and Tinsley, 1980). Per tutto quanto riferito in precedenza, in natura risulta assai difficile reperire piante *Ni-free*, ma si può cercare di ridurre il contenuto di Ni nel pomodoro attraverso adeguate pratiche agronomiche.

Mentre esperienze su altri alimenti ipoallergenici sono ben sviluppate (ad esempio, prodotti cerealicoli senza glutine o latticini senza lattosio), una conoscenza specifica per i prodotti ipoallergenici a basso contenuto di Ni è quasi assente; mancano ancora pratiche agricole per limitare l'assorbimento di Ni e ridurre l'input e i costi di pesticidi e fertilizzanti, migliorando al contempo il valore nutrizionale della frutta. Nella maggior parte dei casi, i genotipi di pomodoro sono stati analizzati dal punto di vista agronomico e tecnologico in funzione dei benefici nutrizionali legati alla presenza di licopene nel frutto, senza considerare la produzione di proteine allergeniche (ad esempio LTP) e il contenuto di Ni che potrebbe aumentare il rischio di allergie. Attualmente mancano linee guida per la catena agroalimentare ipoallergenica del pomodoro. Un nuovo approccio potrebbe fornire una produzione di pomodoro di alto valore per i coltivatori e i consumatori.

L'obiettivo finale del progetto di ricerca è stato perciò valutare le condizioni colturali idonee alla produzione di pomodoro contenente una quantità di Ni bassa (0,25 e 0,40 mg/kg di sostanza secca), in confronto alle concentrazioni di metallo attribuite al pomodoro fresco e ordinariamente stimate a più di 1 mg/kg di alimento in funzione delle caratteristiche fisico-chimiche dei suoli agricoli e delle pratiche colturali anche in relazione, in particolare concimazioni e trattamenti fitosanitari.

Una volta evidenziate le metodologie più adeguate a rendere la coltura di pomodoro Ni-free, ne è stato valutato il potenziale allergenico anche in funzione del contenuto di proteine allergeniche presenti, attraverso tecniche sperimentali *in vitro*.

Fra gli allergeni delle piante, le LTP sono piccole proteine ad alta stabilità, ubiquitarie nei tessuti vegetali (Radauer *et al.*, 2008). La famiglia delle LTP vegetali include due sottofamiglie, 9k-LTP e 7k-LTP, in relazione alla massa molecolare, rispettivamente 9 kDa e 7 kDa, (Giangrieco *et al.*, 2015). La loro ingestione, inalazione e contatto può causare reazioni allergiche anche molto gravi che vanno dalla sindrome allergica orale (OAS), coinvolgimento gastroenterico, angioedema e shock anafilattico, (Fernández-Rivas *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2012).

Ad oggi, diversi allergeni al pomodoro sono stati identificati e registrati dalla nomenclatura dell'OMS/IUIS (International Union of Immunological Societies), tra cui un 7k-LTP (Sola I 6) e diverse isoforme di 9k-LTP (Sola I 3). L'elenco degli allergeni del pomodoro include anche Sola I 1, una profilina 14 kDa, Sola I 2, un 50 kDa betafructofuranosidase; Sola I 4, una proteina intracellulare correlata alla patogenesi TSI-1 (Tachicardia Sinusale Inappropriata) della famiglia Bet v 1 (Welter *et al.*, 2013), Sola I 5, una ciclofilina. Ulteriori allergeni, o allergeni putativi, non ancora inclusi nella nomenclatura dell'OMS-IUIS, come 11 Globulina S, proteina ribosomica P2, chitinasi, glucanasi, perossidasi, poligalatturonasi, taumatina e vicillina sono stati segnalati e inseriti nel database Allergome (www.allergome.org).

Allo stato attuale non era mai stata indagata la possibile associazione fra presenza di proteine allergeniche e il contenuto di Ni nel pomodoro.

Considerato il consumo significativo del consumo di pomodoro in Europa negli ultimi 20 anni (ad esempio, la Grecia con 104 kg/pro capite, l'Italia con 55 kg/pro-capite, la Danimarca con 30 kg/pro-capite) sono da valutare i rischi per la salute derivanti dall'elevata assunzione di Ni. Inoltre, allo stato attuale circa il 17% dei cittadini europei esclude i prodotti contenenti pomodoro dalla dieta a causa delle allergie connesse (Uter *et al.*, 2016).

Obiettivi della ricerca sono stati: 1) identificare genotipi di pomodoro, maggiormente utilizzati in Liguria, a minor accumulo di Ni nel frutto; 2) individuare le condizioni per la coltivazione che riducano l'uptake del metallo nella pianta; 3) valutare il potenziale allergenico dei frutti così ottenuti.

La tesi è composta di sette capitoli principali suddivisi come segue. Nel capitolo 1 della tesi è stata descritta l'importanza economica e nutrizionale del pomodoro ed il relativo contesto produttivo in Liguria, individuando le cultivar di maggior interesse. Nel capitolo 2 sono stati approfonditi il ruolo e la presenza del Nickel nell'ambiente, nelle piante e negli alimenti e le relative norme, quando presenti. Nel capitolo 3 si sono riportati i diversi aspetti conosciuti sull'allergia al pomodoro, sulla sindrome SNAS, sulle proteine allergeniche del pomodoro nonché i dati epidemiologici europei e nazionali conosciuti su tali sindromi.

Nel capitolo 4 sono stati descritti gli obiettivi e le fasi della ricerca mentre nel capitolo 5 sono riportate le metodologie adottate nelle diverse fasi sperimentali:

- 1) Test di somministrazione del Ni al pomodoro in microcosmo e valutazione degli effetti sulla germinazione e prime fasi di sviluppo sulle diverse cultivar scelte;
- 2) Somministrazione del Ni nel suolo di crescita alle piante delle diverse cultivar di pomodoro in test in mesocosmo e ambiente controllato e valutazione degli effetti sulla biomassa e la fruttificazione nonché sul trasferimento del metallo dal suolo ai frutti
- 3) Metodi colturali fuori suolo Ni-free in azienda agricola di piante di pomodoro e valutazione del contenuto di Ni nei frutti
- 4) Determinazione e valutazione del potenziale allergenico dei frutti di pomodoro come sopra ottenuti alle fasi 2) e 3) sperimentali attraverso la determinazione del contenuto di proteine allergeniche e test di reattività dei sieri di pazienti allergici al pomodoro a contatto con gli estratti dei frutti di pomodoro ottenuti dalle fasi 2) e 3) sperimentali.

Nel capitolo 6 sono stati illustrati i risultati ottenuti che hanno evidenziato una correlazione significativa fra quantitativi di Ni somministrato al suolo di crescita delle piante e Ni rinvenuto nei frutti mentre per quanto riguarda l'analisi del contenuto delle proteine allergeniche nei frutti di pomodoro a diverso contenuto di Ni e la risposta anticorpale dei sieri di pazienti allergici al pomodoro a contatto con gli estratti dei pomodori a diverso contenuto di Ni i risultati sono stati piuttosto differenziati, riscontrando una correlazione fra livelli di Ni presenti nei pomodori e profiline ma non per le altre proteine allergeniche. Nel capitolo 7 vengono discussi i principali risultati.

Si conclude che, se per quanto le correlazioni con le proteine allergeniche necessiti di ulteriori approfondimenti, per quanto invece concerne la prevenzione della sindrome SNAS, dipendente dal contatto con il nichel, i prodotti del pomodoro a basso contenuto di questo metallo rappresentano una importante occasione di iniziare una produzione di eccellenza dedicata ai soggetti allergici e valorizzazione di un prodotto ortofrutticolo di primaria importanza per l'economia italiana.

1. IL POMODORO

1.1 Il pomodoro: importanza economica e nutrizionale

Il pomodoro, *Solanum lycopersicum* L., è una specie annuale appartenente alle Solanacee, una famiglia che comprende diverse specie vegetali di interesse economico come patate, melanzane, peperoni e tabacco. Originaria del Centro e Sud America (Perù, Messico), venne importata in Europa dagli spagnoli nel XVI secolo. Inizialmente utilizzata ad uso ornamentale, divenne successivamente importante come coltura alimentare. In Italia, le prime coltivazioni furono portate dalla Spagna dapprima in Campania, Sicilia, Sardegna e poi, lentamente, al Nord, in Liguria ed Emilia Romagna (Bergougnoux 2014; Mattioli 1557).

Per quanto riguarda la macromorfologia (fig. 1), *S. lycopersicum* è una pianta erbacea coltivata come annua (ma con forme perenni o bienni), che può raggiungere i 3 m. Presenta una radice a fittone con abbondanti ramificazioni che formano un denso ed esteso apparato radicale. Il fusto è angoloso, sarmentoso e può avere crescita indeterminata, cioè con meristema apicale in continuo sviluppo, oppure crescita determinata, in base al tipo di cultivar. Sia il fusto sia le foglie sono pubescenti con corti peli ghiandolari che, qualora strofinati, emanano un odore caratteristico. Le foglie sono alterne, 2-pennatosette, 8-15 x 13-25 cm, con 7-9-11 segmenti ovali, incisi o dentati in modo grossolano, intercalati da segmenti più piccoli. I fiori sono riuniti in cime in numero variabile da 3 a 20. I fiori sono gialli, bisessuati con calice a 5 sepali laciniati, pelosi, parzialmente concresciuti e una corolla di 5 (raramente più) petali parzialmente fusi. Il pistillo ha ovario supero, pluriloculare, sormontato da stimma a capocchia; gli stami, in numero uguale ai petali, formano un manicotto intorno al pistillo. L'impollinazione è anemofila ed è favorita da insetti pronubi. La maggior parte delle varietà coltivate sono autogame. Il frutto è una bacca di forma e dimensioni variabili e presenta un colore da giallo a rosso a maturazione. L'ampia variabilità dei caratteri è stata illustrata e discussa in numerosi volumi e articoli (es. Pignatti, 2018; OECD, 1017; Fullana-Pericàs *et al.*, 2017; Salim *et al.*, 2018).

Il pomodoro è originario di zone tropicali, dove cresce come pianta perenne, ma la sua coltivazione in regioni a clima temperato l'ha resa annuale (Fontana *et al.*, 2008). La temperatura è dunque il fattore che più limita lo sviluppo della pianta e la maturazione dei frutti (Adams *et al.*, 2001; Bertin, 2005).

Il pomodoro è una delle colture alimentari più importanti e una delle componenti principali della dieta mediterranea. Il consumo regolare di pomodori e di prodotti a base di pomodoro è associato ad una minore incidenza di alcune importanti malattie croniche, prevenendo quindi lo sviluppo di diversi tipi di cancro, tra cui il cancro ai polmoni, allo stomaco e alla prostata, e riducendo i rischi di malattie cardiovascolari (Giovannucci, 1999; Riccioni, 2009). Gli effetti

benefici per la salute sono dovuti ai micronutrienti contenuti nel pomodoro, come i carotenoidi, l'acido ascorbico, i tocoferoli, i fenilpropanoidi (monofenoli e polifenoli) e i folati. Inoltre, il pomodoro costituisce quasi l'unica fonte disponibile di licopene, il carotenoide responsabile del colore rosso intenso del frutto maturo (Beecher, 1998).

Tuttavia, se si considera solo il contenuto di carboidrati, lipidi e proteine, appare chiaro che il pomodoro non ha elevati valori nutrizionali. Infatti, 100 g di pomodoro fresco sono costituiti da circa 95 g di acqua, 0,9 g di proteine, 0,2 g di lipidi totali, 1,2 g di fibre, 2,63 g di zuccheri e hanno un valore energetico di 18 kcal («USDA, Food Composition Databases» 2016).

Ciò che rende il pomodoro competitivo sul mercato è dovuto però alla qualità del frutto valutabile sulla base dei solidi solubili e insolubili. I solidi solubili, rappresentati da zuccheri (glucosio e fruttosio) e acidi (citrato, malato e glutammato), assieme ai composti volatili, caratterizzano il sapore del pomodoro (Baldwin *et al.*, 2000). I solidi insolubili, rappresentati da componenti della parete cellulare e dalle proteine, definiscono invece la consistenza del frutto e determinano la viscosità dei lavorati industriali, come succo di pomodoro, ketchup, zuppe, salse, passate e concentrati (Bergougnoux 2014).

Oltre all'importanza nutrizionale e agli effetti benefici del pomodoro, bisogna anche tener conto dei possibili aspetti negativi. Infatti, il pomodoro risulta essere un alimento in grado di innescare sintomi cutanei ed extra-cutanei dovuti al Ni contenuto in esso (Ricciardi *et al.*, 2014).

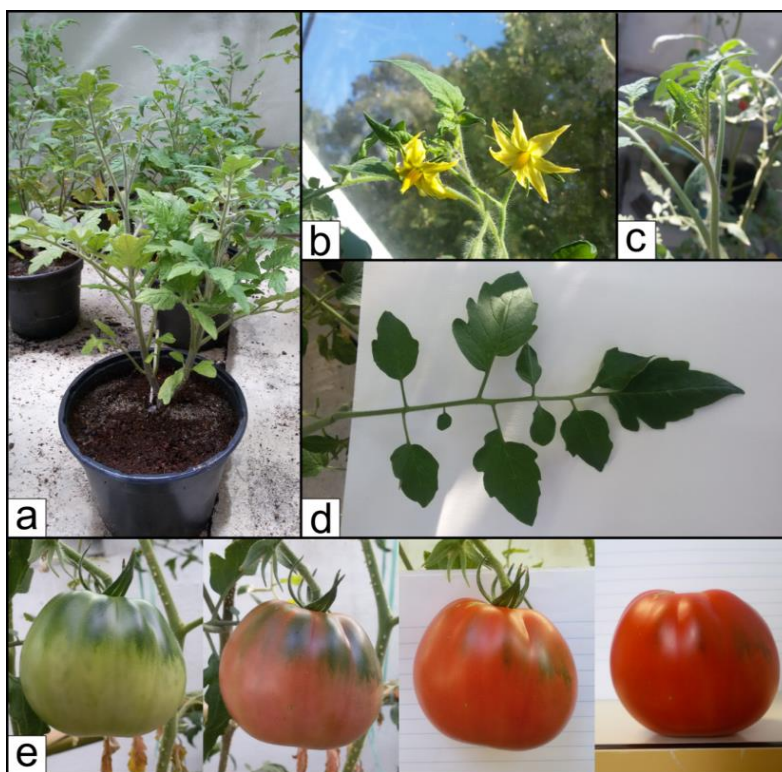


Figura 1 - Caratteri morfologici di *S. lycopersicum*: a) Giovane pianta; b) fiori all'antesi; c) apice vegetativo; d) foglia; e) stadi di maturazione del frutto.

1.2 La produzione di pomodoro nel mondo

Ad oggi, la produzione del pomodoro è al settimo posto nel mondo dopo le colture di mais, grano, riso, patate, soia e manioca («FAO, <http://www.fao.org>» s.d.). Nel 1996 la produzione mondiale di pomodoro era di 92 milioni di tonnellate, ma in un ventennio è quasi raddoppiata, raggiungendo i 177 milioni di tonnellate. Nello stesso periodo temporale, anche l'area dedicata a questa coltura è aumentata, passando da 3,4 a 4,7 milioni di ettari («FAO, <http://www.fao.org>» s.d.). Il mercato del pomodoro è dominato dall'Asia, infatti Cina e India sono responsabili del 60% della produzione mondiale di pomodoro; seguono in ordine: Stati Uniti, Turchia, Egitto, Italia, Iran, Spagna, Brasile, Messico. E' interessante notare che i paesi del Nord Europa, in cui le condizioni climatiche non sono favorevoli e l'area dedicata alla coltura del pomodoro è molto piccola, hanno un raccolto maggiore in termini di kg ettaro-1 («FAO, <http://www.fao.org>» s.d.). Questo può essere dovuto al fatto che le coltivazioni in serra, adottate da questi paesi, migliorano la resa produttiva di questa coltura.

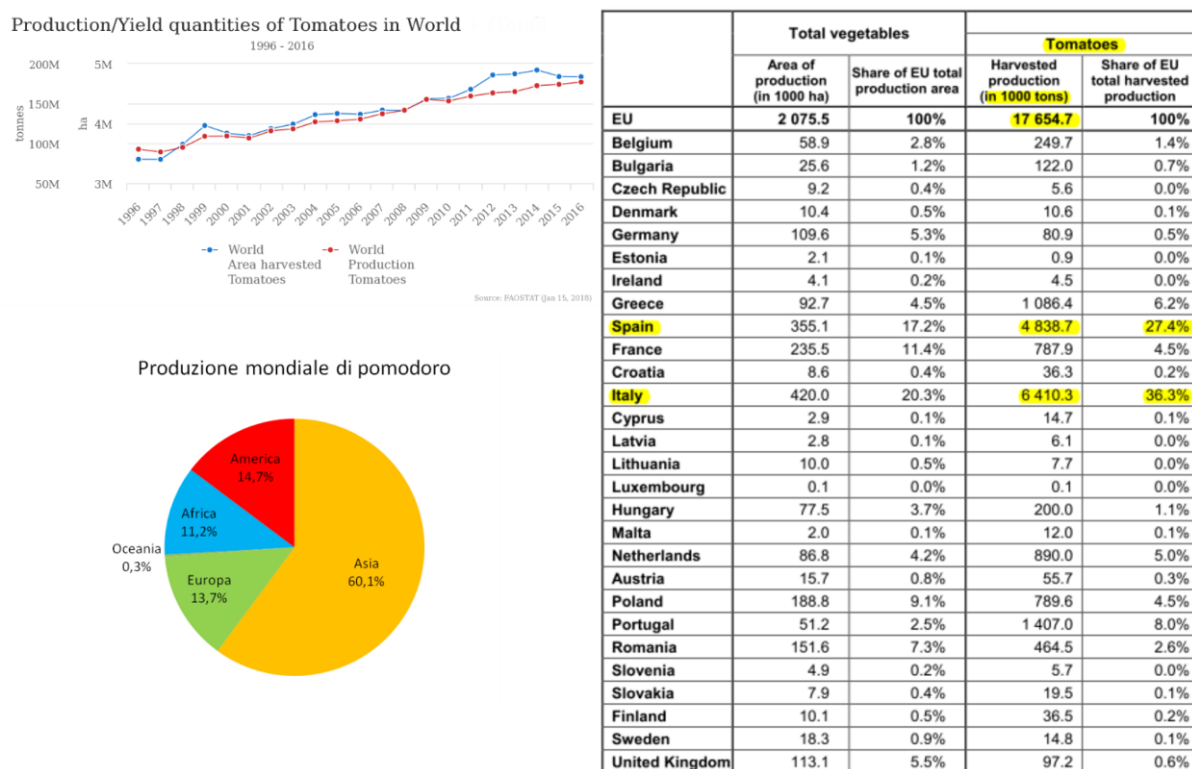


Figura 2 - Produzioni mondiali (FAOSTAT) ed europee (EUROSTAT) di pomodoro.

Il pomodoro è l'ortaggio più prodotto a livello Europeo, infatti ne sono state prodotte 17,6 milioni di tonnellate nel 2015. I due terzi dell'intera produzione provengono essenzialmente da Italia, con 6,4 milioni di tonnellate, e Spagna con 4,8 milioni di tonnellate (Eurostat 2016) (fig. 2). Parlando dell'Italia, c'è una forte disparità a livello regionale per quanto riguarda il raccolto e la superficie investita per la produzione del pomodoro. Dati aggiornati al 2017 indicano la Sicilia al primo posto come maggiore produttrice di pomodoro coltivato in piena aria destinato al

consumo fresco (8.100 ettari di superficie per 1.600 tonnellate di raccolto) e per quello coltivato in serra (3.091 ettari per 1.500 tonnellate). Diversamente succede per il pomodoro da industria, dove Puglia ed Emilia-Romagna dominano il mercato italiano destinando rispettivamente 19.630 e 25.506 ettari alla coltivazione e producendo circa 16.000 tonnellate di pomodoro ciascuna. Sebbene la Liguria non si trovi tra le regioni maggiori produttrici di pomodoro, dati provvisori del 2017 attestano un raccolto di 28,05 tonnellate di pomodoro da mensa coltivato in piena aria e 9,24 tonnellate di pomodoro coltivato in serra («Istat» 2017).

1.3 Impatto della produzione di pomodoro nella catena agroalimentare, dai produttori ai consumatori

La produzione di pomodoro nel 2015 nell'UE-28 equivaleva a 17,6 milioni di tonnellate, di cui circa due terzi provenienti da Italia e Spagna (11,2 milioni di tonnellate). Tra le singole colture orticole dell'UE, quella del pomodoro occupa la superficie coltivabile più grande, pari a 11,7% della superficie totale utilizzata per la verdura. Tale produzione orticola rappresenta il 25% della produzione agricola italiana in campo aperto e il 13% della coltura in serra (Eurostat, 2015). La produzione del solo pomodoro fresco è di elevato valore, pari a 7 miliardi di euro.

La produzione primaria europea di pomodori risulta ad oggi altamente diversificata per genotipi e pratiche colturali, dai genotipi locali e antichi coltivati da seme in campo aperto seguendo pratiche tradizionali ai genotipi appositamente selezionati per l'industria alimentare, innestati, più resistenti ai parassiti e coltivati in serre, spesso fuori suolo.

Ad oggi non esiste una specifica filiera agroalimentare dedicata ai pomodori ipoallergenici ed è necessaria una nuova visione integrata della filiera produttiva per una produzione sostenibile e sicura. I dati statistici forniti dal sistema camerale sull'agricoltura ligure evidenziano un lento ma costante processo verso il ridimensionamento del comparto (Tab. 1).

Province	N. Imprese agricole			Variazione %	
	2014	2015	2016	2015/2014	2016/2015
Genova	1.751	1.718	1.695	-1,9	-1,3
Imperia	4.004	3.831	3.790	-4,3	-1,1
Savona	3.029	2.921	2.884	-3,6	-1,3
La Spezia	1.005	995	1.005	-1,0	1,0
Liguria	9.789	9.465	9.374	-3,3	-1,0

Tabella 1, Andamento comparto agricolo in Liguria anni 2014-2016 fonte Istat

In Liguria il calo è relativo sia al numero delle aziende agricole, sia alla Superficie Agricola Utilizzata (SAU); basti pensare che ben il 18% della SAU nella sola provincia di Imperia non è effettivamente utilizzata (CensStat, 2015). È peraltro da considerare che in Liguria tutto il settore floricolo ed orticolo è attualmente soggetto ad un maggiore ridimensionamento. Sebbene alcune attività stiano fornendo nuovi impulsi al settore valorizzando la filiera del florovivaismo, le prospettive non sembrano essere incoraggianti. La perdita di competitività, legata soprattutto a problemi strutturali e logistici, la polverizzazione e la frammentazione dell'offerta, a cui si aggiungono l'aumento della concorrenza internazionale con costi di produzione nettamente inferiori, nonché la diminuzione dei consumi, hanno ridotto notevolmente il mercato di questa tipologia di imprese. L'esigenza che arriva dal comparto è quella di ripensare alle strategie e alle attività produttive di punta, valutando le nuove opportunità che il mercato offre in questo momento.

In aggiunta, si riscontra una sempre maggiore partecipazione dei consumatori che desiderano acquistare un prodotto sicuro per la salute, tracciato ed organoletticamente appetibile.

Dai dati desunti dall'annuario statistico regionale 2015 emerge che in Liguria la coltivazione di pomodoro è distribuita fra le 4 province liguri come riportato in Fig. 3. In tab. 2 vengono riportate anche il numero di aziende agricole liguri che coltivano pomodoro, distinte per classe di superficie utilizzata.

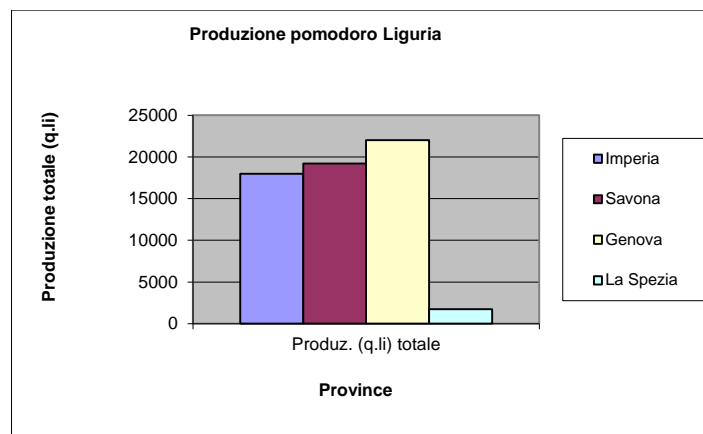


Figura 3 - Aziende agricole che producono pomodoro in Liguria anno 2015 fonte Istat

Classe di superficie agricola utilizzata	0,01 - 0,99 ettari	1-1,99 ettari	2-2,99 ettari	3-4,99 ettari	5-9,99 ettari	10-19,99 e oltre ettari	totale
Utilizzazione dei terreni							
pomodoro da mensa in pieno campo	327	229	78	79	40	12	765
pomodoro da industria in pieno campo	27	23	5	8	6		69

Tabella 2 - Utilizzazione del terreno delle aziende dati estratti il 21 set 2017, 14h03 UTC (GMT), da AgriStat

Da indagini presso i principali produttori è emerso che la varietà di pomodoro maggiormente coltivata in Liguria risulta essere 'Cuore di bue', pomodoro da mensa.

2. IL NICHEL

2.1 Il Nichel nell'ambiente

Il Nichel (Ni) è un elemento chimico appartenente ai metalli di transizione. In natura è generalmente presente nei minerali ferromagnesiaci (olivine, ortopirosseni e spinelli) dal momento che la dimensione intermedia del suo ione bivalente (Ni^{2+}) le permette di sostituirsi agli ioni metallici Fe^{2+} e Mg^{2+} , costituenti dei suddetti minerali. Di conseguenza, il Ni si ritrova facilmente nelle rocce mafiche e ultramafiche, le quali sono distribuite in tutto il mondo e sono comunemente associate a complessi ofiolitici (Coleman, 2012; Coleman e Jove, 1992; Harrison e Rajakaruna, 2011). Le serpentiniti, che compongono questi complessi litologici, sono note per l'elevata concentrazione di alcuni metalli tra cui Ni, Cr, Co, Mn (Alves *et al.*, 2011; Kelepertzis e Stathopoulou, 2013; Kierczak *et al.*, 2007; Massoura *et al.*, 2006; Quantin *et al.*, 2008; Rajapaksha *et al.*, 2012). Il Ni, in particolare, è presente nei suoli serpentinitici a concentrazioni tra 500 e 8.000 mg/kg (Ghaderian *et al.*, 2007).

La contaminazione dei terreni agricoli dovuta ai metalli pesanti come il Ni è un problema serio. I metalli possono venire mobilitati nel suolo, assorbiti dalle piante e traslocati nei diversi tessuti vegetali, entrando successivamente nella catena alimentare (Dar *et al.*, 2015) e causando gravi danni alla salute umana (Liu *et al.*, 2013).

Diversi sono i fattori che possono regolare la biodisponibilità dei metalli nel suolo. Il pH è il fattore più importante; la disponibilità dei metalli aumenta al diminuire del pH a causa della sostituzione dei cationi sui siti di legame del suolo con gli ioni H^+ (Pinto *et al.*, 2014). Un alto contenuto di materia organica tende invece ad immobilizzare i metalli nel suolo (Hernandez-Soriano and Jimenez-Lopez, 2012). Altri fattori responsabili della biodisponibilità dei metalli sono: la salinità, la capacità di scambio cationico, la dimensione delle particelle, gli ossidi di Al, Fe e Mn (Pinto *et al.*, 2015).

Oltre alle concentrazioni naturalmente presenti in natura, il Ni può essere immesso nell'ambiente attraverso fonti antropiche. Le principali fonti di Ni nell'Unione Europea sono: la produzione di acciaio inossidabile austenitico e superleghe, la produzione e l'uso di batterie e prodotti chimici (compresi i fertilizzanti), la combustione dei combustibili e la produzione di gas di scarico provenienti dalle industrie (produzione di energia, raffinerie), riscaldamento domestico, traffico veicolare e produzione di acque reflue (EU Ni RA Fact Sheet; Reimann e Caritat, 2012).

Sebbene ci sia un'influenza antropica, è tuttavia noto che la roccia madre formante il suolo risulti essere la principale fonte dell'elevata concentrazione di Ni nel suolo (Albanese *et al.*, 2015).

Il contenuto medio di Ni nei suoli naturali varia tra 13 e 37 mg/kg (Kabata-Pendias, 2011), ma contenuti significativamente più elevati si verificano in terreni ultramafici (> 1000 mg/kg; Kabata-Pendias, 2011 e riferimenti in esso in esso), che superano sistematicamente, fino a un ordine di grandezza, i valori soglia stabiliti dai governi e dalle agenzie ambientali (cfr. Marescotti *et al.*, 2019). Allo stesso modo, nei suoli agricoli il contenuto di Ni generalmente non supera i 100 mg/kg (McGrath, 1995, Antibachi *et al.*, 2012), ma può raggiungere migliaia di mg/kg in aree con rocce ultramafiche (Brooks, 1987, Fornasaro *et al.*, 2019; Marescotti *et al.*, 2019). Inoltre, l'assunzione di Ni di suoli agricoli può derivare anche da ricadute atmosferiche, acque superficiali e sotterranee e ingressi antropogenici diretti (Marmiroli e Maestri, 2008). Tra queste, le ricadute atmosferiche rappresentano un importante e diffuso apporto di Ni nei suoli, anche per le aree remote, a causa dell'aumento mondiale dell'emissione di Ni nell'atmosfera (Nieminen *et al.*, 2007 e riferimenti in esso presenti), principalmente da carbone e combustione di petrolio (Kabata-Pendias, 2011). Gli input antropogenici diretti ai suoli agricoli sono principalmente dovuti a fertilizzanti minerali, pesticidi, compost, fanghi di depurazione e letame (Marmiroli & Maestri, 2008).

La mobilità di Ni nei suoli è rigorosamente controllata da materia organica, ossidi amorfi (principalmente ossidi Fe e Mn) e minerali argillosi. Ossidi e minerali di argilla possono rilasciare il metallo alla soluzione del suolo a seconda delle variazioni di pH. Inoltre, anche se la solubilità di Ni in acqua è generalmente bassa (< 2 g/L), può aumentare significativamente in presenza di composti organici disciolti perché può formare complessi solubili con ligandi organici (Griffin & Chassé, 2018), diventando potenzialmente biodisponibile. Ad esempio, la mobilità del Ni è piuttosto elevata nei suoli ricchi di organici acidi, dove gli acidi fulvici e umici sono formati dalla decomposizione di materiale organico (Nieminen *et al.*, 2007; Kabata-Pendias, 2011).

La maggior parte dei suoli europei è caratterizzata da concentrazioni di Ni: <48 mg/kg per i suoli agricoli e <51 mg/kg per i suoli adibiti a pascolo, con valori inferiori nel Nord Europa, verso i paesi baltici e scandinavi (Albanese *et al.*, 2015). In generale, le concentrazioni di Ni sono maggiori nella parte nord-occidentale dell'Italia (Toscana, Liguria, Piemonte) e nei Balcani. I valori più alti (>109 mg/kg nei suoli agricoli e >114 mg/kg nei pascoli) sono spesso associati a masse ofiolitiche e a rocce sedimentarie che si formano da esse per erosione (Albanese *et al.*, 2015; Cicchella *et al.*, 2015).

Non si può escludere che, in alcune zone caratterizzate da agricoltura intensiva, quali ad esempio la pianura alluvionale del fiume Po, le elevate concentrazioni di Ni potrebbero riflettere la coesistenza sia di una fonte sedimentaria (Ni proveniente da erosione di rocce mafiche ed ultramafiche, in particolare serpentiniti) (Bianchini *et al.*, 2013), sia di un input antropogenico, come l'uso di fertilizzanti fosfatici (Nziguheba and Smolders, 2008).

In Liguria sono presenti estesi complessi ofiolitici. In base alle cartografie geologiche più recenti, realizzate nell'ambito di progetti nazionali e regionali (CARG e CGR), in Liguria, i principali litotipi potenzialmente correlati ad elevate concentrazioni di Ni sono Lherzoliti, Serpentiniti e Oficalciti. Nell'ambito di tali approfondimenti è emerso che, in particolare, le concentrazioni di questo metallo nei suoli sono frequentemente superiori a quelle indicate nella Tab. 1 dell'All. 5 alla Parte IV del D.lgs. 152/06 (Concentrazione soglia di contaminazione nel suolo e nel sottosuolo riferiti alla specifica destinazione d'uso dei siti da bonificare) pari a 120 mg/kg per siti ad uso Verde pubblico, privato e residenziale e 500 mg/kg per le aree industriali.

La direttiva 86/278/CEE sull'utilizzo dei fanghi di depurazione in agricoltura stabilisce le concentrazioni di riferimento per i metalli pesanti nel terreno agricolo europeo. I valori limite stabiliti dalla direttiva possono essere utilizzati come riferimento per valutare il rischio ambientale derivato da metalli in terreno agricolo su scala europea. La direttiva stabilisce intervalli limite per il Ni che vanno da 30 a 75 mg/kg, con un pH del terreno da 6 a 7. Inoltre, è stato osservato che le concentrazioni massime autorizzate di questi metalli non devono superare i valori limite fissati per più del 50%. 'Nell'Europa centrale e settentrionale le concentrazioni di Ni in terreni agricoli sono generalmente al di sotto del rispettivo valore minimo di riferimento europeo; nell'area mediterranea, tali concentrazioni hanno superato l'intervallo di riferimento compreso tra 30 e 75 mg/kg per quasi tutti i campioni di terreno raccolti nei paesi balcanici. Nel nord Italia, la concentrazione di Ni supera il limite minimo europeo (30 mg/kg) nella maggior parte dei campioni di terreno agricoli raccolti nella valle del Po e nel settore settentrionale dell'Appennino, mentre il limite massimo (75 mg/kg) è superato in Toscana e in Liguria (Albanese *et al.*, 2015).

Infine, se si applicano i valori di riferimento della Direttiva europea e si considera il terreno agricolo dell'Italia nord-occidentale, dove la geochimica è influenzata dalla presenza naturale di rocce mafiche e ultramafiche come roccia madre, allora si dovrebbe considerare quel suolo come non idoneo per l'agricoltura. Questo è ovviamente assurdo perché si dovrebbe tener conto piuttosto dei livelli di background naturale per quanto riguarda la concentrazione del Ni in suolo agricolo prima di impostare i valori delle linee guida. Come

hanno dimostrato Albanese *et al.* (2015), è inappropriato stabilire un valore di orientamento da applicare a tutti i paesi europei.

2.2 Importanza e potenziale tossicità del Nichel nelle piante

Il Ni è considerato un microelemento essenziale nelle piante superiori poiché è un cofattore dell'enzima ureasi (Dixon *et al.*, 1975), necessario per il metabolismo dell'azoto (Brown *et al.*, 1990, 1987a; Eskew *et al.*, 1984). Una carenza di Ni comporta una diminuzione dell'attività dell'ureasi (Eskew *et al.*, 1983) e di altri enzimi responsabili della riduzione dei nitrati, ma anche una diminuzione della sintesi proteica (Brown *et al.*, 1990). Inoltre, si è registrato un accumulo di urea, nitrati e diversi amminoacidi che causano chiari sintomi di clorosi e necrosi fogliare in piante di soia, orzo e cetriolo (Brown *et al.*, 1990; Eskew *et al.*, 1984; Watanabe e Shimada, 1990). Effetti più sorprendenti dovuti a carenza di Ni sono stati descritti in cereali, come orzo, avena e frumento, in cui si sono osservati: riduzione della crescita, senescenza precoce, diminuzione dei livelli di ferro, inibizione dello sviluppo e maturazione dei chicchi (Brown *et al.*, 1987b).

Effetti deleteri non sono causati soltanto da una carenza di Ni, ma si hanno anche quando questo si ritrova in concentrazioni eccessive, risultando quindi tossico per la maggior parte delle specie vegetali (Yang *et al.*, 1996).

Il Ni è essenziale per la nutrizione delle piante solo a concentrazioni molto basse, variando tra 0,05 e 10 mg/kg di peso secco (Nieminen *et al.*, 2007). I livelli di tossicità critica sono pari a 10 mg/kg di peso secco in specie sensibili (Kozlov, 2005), 50 mg/kg in specie moderatamente tolleranti (Bollard, 1983) e 1.000 mg/kg in piante iperaccumulatrici (Küpper *et al.*, 2001; Pollard *et al.*, 2002).

L'effetto della fitotossicità del Ni varia in base a diversi fattori: alla biodisponibilità del metallo nel suolo (Khalid e Tinsley, 1980) e alla forma chimica con cui si presenta in ambiente (Molas, 2002), al tipo di specie vegetale che si considera (Mizuno, 1968), allo stadio di crescita delle piante (Sheoran *et al.*, 1990), al pH del suolo (Li *et al.*, 2013).

Elevate concentrazioni di Ni nei vegetali possono interferire con numerosi processi fisiologici e biochimici. Diversi autori hanno evidenziato: una riduzione dell'attività mitotica nelle radici (L'Huillier *et al.*, 1996), una riduzione della concentrazione fogliare di clorofilla e danno ai cloroplasti (Molas, 2002), una diminuzione del tasso fotosintetico e dell'attività degli enzimi chiave del ciclo di Calvin (Sheoran *et al.*, 1990), una riduzione del tasso di traspirazione (Pandey and Sharma, 2002) e del contenuto d'acqua relativo (Gajewska *et al.*, 2006), un'alterazione dell'attività degli enzimi antiossidanti (SOD - superossido dismutasi,

CAT - catalasi, POD - perossidasi, GST – glutathione S transferasi) (Gajewska *et al.*, 2006) e quindi l'induzione di stress ossidativo (Chen *et al.*, 2009; Gopal, 2014), una riduzione dell'assimilazione di azoto nelle radici (Gajewska *et al.*, 2009), un'interferenza con l'assorbimento e la traslocazione di macro e micronutrienti essenziali come Ca, Mg, Mn, Fe, Cu e Zn (Chen *et al.*, 2009).

Tutte queste alterazioni dovute alla fitotossicità del Ni si manifestano a livello macroscopico come: riduzione della crescita, clorosi, necrosi, appassimento fogliare, riduzione della resa e della qualità della frutta (Chen *et al.*, 2009; Gajewska e Sklodowska, 2007; Kopittke *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda le piante di pomodoro si può affermare da diversi studi che elevate concentrazioni di Ni nel suolo di coltivazione svolgano un effetto negativo, impattando di fatto sul raccolto e sulle biomasse (Kumar *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2016).

2.3 Il Nichel negli alimenti

Il Ni nel suolo e nell'acqua viene assorbito da piante e animali che rappresentano fonti di cibo per l'uomo; il Ni è quindi presente in una dieta normale. Tuttavia, il contenuto di Ni negli alimenti può variare ampiamente a seconda della sua concentrazione nel terreno e nell'acqua, che dipende a sua volta dall'utilizzo di fertilizzanti sintetici e prodotti fitosanitari, dalla contaminazione da rifiuti industriali e urbani, dalla distanza dalle fonderie che utilizzano il Ni. Per questi motivi, i dati sul contenuto di Ni nei singoli alimenti possono spesso variare in base alle fonti con differenze talora significative. Oltre all'assunzione di Ni tramite l'alimentazione, si può essere esposti a questo metallo anche attraverso altre vie, come l'inquinamento atmosferico e il fumo di sigaretta, il contatto con materiali contenenti Ni (gioielli e monete), bere acqua contaminata; oppure, il Ni può venir rilasciato durante la cottura dei cibi, quindi attraverso l'uso di pentole e utensili da cucina in acciaio inossidabile (Pizzutelli, 2011; Ščančar *et al.*, 2013).

La maggior parte del Ni assunto con la dieta viene escreto con le feci, mentre in piccola parte viene escreto con le urine e il sudore. Di solito viene assorbito nel tratto gastrointestinale meno del 10% del Ni presente nel cibo, ma questa quantità aumenta nelle persone che presentano carenza di ferro (Fe) e nelle madri che allattano. Gli ioni divalenti di Ni e Fe sfruttano lo stesso sistema di trasporto per attraversare la mucosa intestinale; quindi se il Fe viene trasportato, il Ni è escluso (Frieden, 2012). Di conseguenza, le persone sensibili al Ni dovrebbero includere alimenti ricchi di Fe nella loro dieta (Cunningham, 2017).

Il contenuto di Ni in frutta e verdura (0,5-5 mg/kg) è in media quattro volte superiore rispetto a carne, latte, latticini, uova e altri alimenti di origine animale (0,1-5 mg/kg) (Sharma, 2007). Sebbene il Ni sia presente in tutti i cibi, alcuni gruppi di alimenti sono generalmente considerati più ricchi. Tuttavia, gli elenchi di alimenti ad alto contenuto di Ni disponibili nella letteratura scientifica sono difficili da confrontare perché non è stata stabilita alcuna soglia in comune per definire un alimento come "ad alto contenuto di Ni". Gli alimenti che vengono considerati ad alto contenuto di Ni, indipendentemente dalla concentrazione presente nel terreno in cui crescono, sono: arachidi, fagioli, lenticchie, piselli, soia, avena, cacao (e cioccolato), noci, farina di grano integrale (Pizzutelli, 2011).

Per quanto riguarda il pomodoro, la concentrazione di Ni nel frutto dipende dalla cultivar, dal terreno di coltivazione, dalla tecnica colturale e dal grado di maturazione del frutto (Bressy *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2015; Poulik, 1999). Per queste ragioni, gli autori hanno trovato diverse concentrazioni di Ni (mg/kg) nei frutti di pomodori coltivati in suoli non contaminati da questo metallo: 0,3-0,8 (Bressy *et al.*, 2013); 0,08-0,3 (Taharn *et al.*, 2014); 0,1-1,0 (Rodriguez-Iruretagoiena *et al.*, 2015); 0,2-0,3 (Mustatea *et al.*, 2016) e 0,9 (Pozzatti *et al.*, 2017).

In diversi esperimenti, in cui si sono coltivate piante di pomodoro in suoli contaminati con il Ni a concentrazioni crescenti o ammendati con compost, fanghi o acque di depurazione è stato dimostrato che la maggior parte del Ni presente nel suolo rimane concentrato nelle radici e poco viene traslocato nei frutti e nelle altre porzioni aeree (Gad *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2015; Rehman *et al.*, 2016). In linea di principio si ha una concentrazione di Ni che decresce in questo senso: radici > foglie > fusti > frutti. Va tuttavia sottolineato che sia le condizioni colturali citate da questi autori, sia le concentrazioni di Ni somministrate rendono spesso il metallo limitatamente scambiabile.

Attualmente manca una legislazione specifica sul Ni negli alimenti. L'unico limite massimo nella legislazione europea (direttiva comunitaria 98/82/CE, seguita dal decreto legislativo italiano 31/2001) riguarda l'acqua potabile con un livello massimo di 20 µg/l (invece di 70 µg/l suggerito dall'OMS). Per quanto riguarda il Ni negli alimenti, non ci sono limiti di legge, ma l'assunzione giornaliera tollerabile per il peso corporeo è pari a 2,8 µg Ni/Kg (EFSA, 2015). La Commissione Europea ha adottato la raccomandazione (UE) 2016/1111 per monitorare il Ni negli alimenti in tutti gli Stati membri dal 2016 al 2018 campionando la maggior parte degli alimenti rappresentativi, compresi i pomodori, propedeutica alla individuazione di limiti legislativi.

3. ALLERGIA AL POMODORO

3.1 Allergia al Nichel

L'importanza nutrizionale e la funzione biochimica del Ni nell'uomo non sono ancora ben chiare (Otten *et al.*, 2006). Tuttavia, il Ni viene considerato come un "elemento potenzialmente essenziale" per l'uomo già dagli anni '70 (Nielsen and Ollerich, 1974), sulla base di studi condotti su modelli animali. Infatti, una carenza di Ni può portare a diverse manifestazioni patologiche (Underwood, 2012).

Sebbene il fabbisogno di Ni nell'uomo sia stato stimato tra 25 e 35 µg al giorno (Anke *et al.*, 1995), problemi riguardanti la carenza di questo metallo non sono mai stati riportati nella letteratura scientifica perché la sua assunzione attraverso l'alimentazione supera di gran lunga queste quote (Committee for Medicinal Products for Human Use, 2008). Al contrario, il Ni è largamente studiato per i suoi potenziali effetti nocivi sulla salute umana. Diversi autori hanno riportato dati relativi alla correlazione tra l'ingestione di alimenti contenenti Ni e l'insorgenza di sintomi cutanei e gastrointestinali (Abeck *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 2003; Mahdi *et al.*, 1996; Zirwas and Molenda, 2009).

La maggior presenza di allergia al pomodoro va dall'1,5% del nord Europa (Petersen *et al.*, 1996) al 16% dell'Italia (Ortolani *et al.*, 1996) fra la popolazione allergica. L'allergia al pomodoro pare sia legata ad alcune Lipid Transfer Protein o LTP (Sola 1,3 LTP) ma, molto spesso, accanto a quella che può essere una allergia IgE reattiva alle proteine, vi è una reattività legata alla presenza di Ni nel frutto. Sebbene il pomodoro non sia uno degli alimenti a maggior concentrazione di Ni (0.09 mg/kg; Pingitore, 2014) esso rappresenta un alimento largamente utilizzato, il cui consumo è notevolmente aumentato negli ultimi 20 anni (Pravettoni *et al.*, 2009).

Con particolare riferimento alla ricerca in oggetto, l'allergia al Ni si può manifestare come dermatite allergica da contatto (Dac) o attraverso un'altra forma patologica definita come Sindrome sistemica da allergia al Ni (SNAS), sindrome in forte progressione epidemiologica.

La SNAS è caratterizzata da disturbi generalizzati a carico di organi e apparati, che interessano il sistema gastrointestinale (vomito, diarrea o stipsi, gonfiore addominale), il sistema respiratorio (asma o rinite), il sistema neurologico (cefalee o disturbi neuroastenici). L'approccio terapeutico è principalmente dietetico, anche se esiste la possibilità di una terapia desensibilizzante. L'ingestione di cibo e il consumo di acqua rappresentano la principale fonte di esposizione al Ni nella popolazione. Gli individui affetti da SNAS escludono il pomodoro dalla propria dieta, con conseguente diminuzione della qualità di vita.

Nel 2015, il gruppo di esperti scientifici dell'EFSA che si occupa dei contaminanti nella catena alimentare (gruppo CONTAM) si è espresso in merito alla valutazione del rischio del Ni contenuto nei vegetali e nelle acque minerali destinate al consumo umano.

L'esposizione cronica al Ni presente negli alimenti va da 3,6 a 20,1 µg/kg Ni per peso corporeo (b.w.) al giorno, ed è superiore, in tutti i gruppi di età, alla dose giornaliera tollerabile (TDI) pari a 2,8 µg/kg Ni b.w., che è stata estrapolata dai dati su animali di laboratorio. Inoltre, l'esposizione della popolazione vegetariana sembra essere leggermente superiore a quella stimata per la popolazione generale, con un'esposizione di 7,1 µg/kg Ni b.w. al giorno. Per quanto concerne gli individui sensibili al Ni, questi possono sviluppare reazioni di riacutizzazione eczematosa nella pelle (dermatite sistemica da contatto) dall'esposizione orale ai sali di Ni. Alla luce di questi dati, il gruppo CONTAM ha concluso che l'esposizione cronica alimentare al Ni è di particolare preoccupazione sia per gli individui sensibili che per la popolazione generale, ed ha selezionato dunque un BMDL10 (limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% relativo alla dose di riferimento associata ad una risposta del 10% dell'effetto) di 1,1 µg/kg Ni b.w. (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2015).

La forma classica di allergia al Ni è la dermatite da contatto (Torres *et al.*, 2009). Tuttavia, nei soggetti più sensibili, il Ni può provocare sintomi cutanei indipendentemente dal contatto diretto con la pelle (Giménez-Arnau *et al.*, 2000) e una dieta a base di cibi ad alto contenuto di Ni può provocare il riacutizzarsi di lesioni eczematose precedenti (Hindsén *et al.*, 2001). Questa condizione è chiamata Systemic Contact Dermatitis (Menné e Veien, 2001). La sensibilità al Ni può anche causare sintomi respiratori, orticaria, angioedema, sintomi gastrointestinali e altre manifestazioni cliniche sistemiche aspecifiche quali cefalea, stanchezza cronica, dispnea postprandiale, cistite e/o vulvovaginite, acne e anemia da carenza di ferro. Questi sintomi cutanei ed extra-cutanei, quando correlati all'ingestione di cibi e bevande contenenti Ni, definiscono la cosiddetta "Sindrome Allergica Sistemica al Ni" (Systemic Nickel Allergy Syndrome, SNAS) (Falagiani *et al.*, 2008).

L'approccio corretto alla diagnosi della SNAS dovrebbe riprodurre l'esposizione naturale, quindi deve essere supportato da una prova di provocazione orale positiva con alimenti ricchi in Ni o con capsule contenenti Ni, dopo una dieta a base di cibi con basso contenuto di Ni (Turi *et al.*, 2008). I pazienti hanno diagnosi di SNAS solo se la sensibilizzazione al Ni è confermata da un patch-test positivo (Antico e Soana, 1999).

3.2 Proteine allergeniche

Il fenomeno allergico è una reazione di ipersensibilità iniziata da meccanismi immunologici Ig E-mediati, legata per lo più alla reattività alla presenza di specifiche proteine.

Il meccanismo di risposta IgE agli allergeni è di cruciale importanza in quanto la produzione di IgE è il primo step nel meccanismo di ipersensibilità allergica al cibo.

Nell'ambito delle allergie alimentari tali meccanismi immunologici sono innescati molto spesso dalla presenza negli alimenti di alcune proteine a basso peso molecolare (LTP), diffusissime nel mondo vegetale e dunque in frutta, ortaggi e cereali. (Cuomo *et al.*, 2018).

Le proteine non specifiche di trasporto dei lipidi (nsLTPs) sono proteine filogeneticamente molto antiche e altamente conservate espresse in tutto il regno vegetale con funzione di difesa. Sono resistenti alla digestione e alla cottura e stabili ai cambiamenti del pH e possono determinare reazioni allergiche di gravità variabile fino allo shock anafilattico. Notoriamente le nsLTPs sono la causa più frequente di allergia alimentare negli adulti e adolescenti, ma la sensibilizzazione si instaura precocemente e prevale in età infantile. Nei soggetti allergici le reazioni sono frequenti per assunzione di frutta di piante appartenenti alla famiglia delle *Rosacee* come pesca o mela e per assunzione di frutta "a guscio". Di solito si osservano reazioni a più di un alimento a causa della cross-reattività tra le diverse nsLTP. L'espressione clinica della sensibilizzazione alle LTP è quella tipica di un'allergia IgE mediata: compare entro un brevissimo tempo dall'assunzione di un alimento che contiene l'allergene e raggiunge la massima espressione in pochi minuti e non oltre poche ore (di solito 2), con l'eccezione della forma sforzo-dipendente, che può manifestarsi fino a 4 ore dopo. Le reazioni possono essere scatenate dall'incontro classico con l'allergene attraverso l'assunzione per via orale e più raramente per inalazione o contatto cutaneo. La diagnosi si basa pertanto sulla storia clinica e sull'identificazione delle IgE specifiche e nei casi dubbi sulla risposta al Test di Provocazione Orale (TPO). La terapia prevede l'eliminazione dalla dieta degli alimenti che sono causa di reazioni avverse mentre è possibile proseguire l'assunzione di quelli tollerati nonostante la sensibilizzazione.

Negli ultimi anni il notevole aumento delle conoscenze circa la composizione molecolare degli allergeni e la possibilità di clonare e sintetizzare singole molecole ricombinanti ha modificato la diagnosi delle allergie alimentari e respiratorie. Oggi è possibile non solo dosare le IgE specifiche per gli estratti di una fonte allergenica (ad esempio Betulla), ma anche quelle dirette verso le singole molecole allergeniche di cui la fonte allergenica è costituita (nel caso ad esempio della betulla le molecole Bet v1, Bet v 2, Bet v 4). Dato che ogni fonte allergenica è costituita da numerose molecole, con caratteristiche allergeniche diverse tra loro, è evidente come sia necessario un continuo aggiornamento delle conoscenze.

Un grande aiuto alla conoscenza del processo proviene dall'incrementata identificazione delle molecole allergeniche (<http://www.allergome.org/script/statistic.php>) e dalla loro disponibilità per studi in combinazione con la microtecnologia. Questi progressi sono favorevoli a sviluppare una medicina più personalizzata, oggi giorno sempre più richiesta.

Tale affermazione sembra adattarsi perfettamente al campo delle allergie in cui il fenotipo clinico è strettamente collegato al riconoscimento immunitario delle IgE e ogni paziente sembra mostrare un quadro clinico diverso rispetto ad un altro. Tale approccio personalizzato, in precedenza quasi impossibile a causa del numero di test da eseguire in ogni paziente, ora sta diventando sempre più fattibile a causa della combinazione biotecnologia / microtecnologia supportata da strumenti informatici recentemente resi disponibili per il lavoro di routine.

Le LTP sono una classe di piccole proteine solubili (7-9 kDa di peso molecolare a 90-95 residui aminoacidici) con 8 residui di cisteina, dotate di catene laterali con gruppi -SH. L'ossidazione di questi gruppi porta alla formazione di 4 legami covalenti, molto forti, detti ponte disolfuro o legami S-S. La presenza dei legami disolfuro è cruciale e conferisce alla proteina un'elevata stabilità al calore, ai cambiamenti di pH e alla proteolisi gastrointestinale. Sono queste le caratteristiche che conferiscono alle LTP le capacità di poter agire finanche come allergene sensibilizzante primario (sensitizer). Sono caratterizzate da una capacità di catalizzare il trasferimento di lipidi tra le membrane; vengono codificate da una larga famiglia di geni e sono abbondantemente espresse in molti tessuti vegetali. La loro abbondanza indica quindi un ruolo chiave nella sopravvivenza delle piante, confermato dal loro coinvolgimento nella difesa contro stress biotici ed abiotici (Salminen *et al.*, 2016). I tegumenti delle piante esposti all'atmosfera sono generalmente costituiti da molecole che riducono la perdita dell'acqua e ostacolano l'ingresso di funghi e batteri patogeni. Le LTP contribuiscono alla formazione di questo rivestimento di difesa e hanno il compito di trasportare verso lo strato esterno i monomeri della cutina e della suberina, principali costituenti dei tegumenti (epidermide e sughero). Ciò spiega perché le LTP sono maggiormente presenti negli strati periferici di alcuni tipi di ortaggi e di frutta. La concentrazione delle nsLTPs è variabile e dipende dalla maturità nonché dalle modalità di conservazione e dalla varietà del frutto. Le LTP sono la causa più frequente di allergia alimentare negli adulti che vivono nell'area mediterranea (Asero *et al.*, 2009b) dove inducono anche il maggior numero di reazioni anafilattiche (Asero *et al.*, 2009a). Essendo allergeni ampiamente distribuiti nel regno vegetale (Egger *et al.*, 2010), le persone sensibili possono manifestare reazioni avverse in seguito all'ingestione di una vasta gamma di alimenti (Asero *et al.*, 2002).

La sindrome da allergia orale (formicolio delle labbra, della mucosa orale, della lingua e delle vie aeree superiori subito dopo aver ingerito il cibo contenente l'allergene) è l'espressione clinica

più frequente di ipersensibilità alle LTP. Questo tipo di reazione avversa può rimanere l'unica per anni o aggravarsi se intervengono dei co-fattori (Asero *et al.*, 2017).

Resistendo sia al calore che alla digestione con pepsina, le LTP sono in grado di raggiungere intatte il tratto intestinale inducendo reazioni allergiche (Asero *et al.*, 2000; Egger *et al.*, 2010). Possono manifestarsi sintomi gastrointestinali come nausea, vomito e diarrea, sebbene nella maggior parte dei casi si riscontrano sintomi sistemici come orticaria, angioedema o anafilassi (Asero *et al.*, 2009a).

Le LTP sono presenti in polpa, buccia e semi del pomodoro sia fresco sia nei derivati industriali (Pravettoni *et al.*, 2009). L'incidenza dell'allergia al pomodoro in Europa varia tra 0,8% a 5,6%, mentre la popolazione italiana sensibile a questo alimento è il 4,5% (Burney *et al.*, 2010).

Fino ad ora 63 LTP sono state caratterizzate come allergeni, 46 di loro espresse in parti commestibili di piante, quasi tutte appartenente alla sottofamiglia proteica LTP1, e solo due afferenti alla sottofamiglia LTP2 (www.allergome.org).

Altra categoria di proteine allergeniche sono le profiline, proteine altamente conservate, presenti in tutte le cellule eucariotiche. Ciò è alla base della cross-reattività delle IgE specifiche per questi allergeni e quindi delle conseguenti sensibilizzazioni crociate tra pollini ed alimenti di origine vegetale (pan-allergeni).

Le profiline sono labili alla digestione e alla cottura e quindi determinano generalmente reazioni allergiche lievi definite sindrome orale allergica (SOA). L'allergia alle profiline si ritrova fondamentalmente in soggetti con pollinosi, che presentano SOA dopo ingestione di alimenti vegetali, ed è da ricercare nei bambini che presentino sensibilizzazioni multiple ad almeno 5 pollini, spesso non alla parietaria. In caso di sintomatologia respiratoria la presenza di IgE specifiche per le profiline deve allertare sulla possibilità che alcune delle positività per i pollini riscontrate non sia dovuta ad un allergene maggiore, ma a cross reattività delle diverse profiline. Reazioni allergiche ad alcuni alimenti (melone, anguria, banana, agrumi e/o pomodoro) possono essere considerate un marker di allergia alle profiline, dopo avere escluso l'allergia al lattice. Ponendo la diagnosi di allergia alle profiline è possibile consentire l'assunzione, se desiderata, degli alimenti responsabili di SOA, ma solo nel caso in cui sia anche possibile escludere l'allergia a molecole di ortaggi e frutta, note come possibili cause di reazioni allergiche gravi. La diagnosi può essere fatta mediante SPT (skin prick test) o con la ricerca delle IgE specifiche utilizzando kit in commercio.

Di solito le profiline sono allergeni minori dei pollini, ovvero sensibilizzano meno del 50% degli allergici a quel polline, mentre possono essere degli allergeni maggiori (sensibilizzare oltre il 50%) in alcuni alimenti di origine vegetale. La prevalenza della sensibilizzazione verso le profiline varia nelle diverse aree geografiche, minore in Scandinavia che non nel centro o sud Europa, ma anche in relazione alle caratteristiche allergologiche delle popolazioni studiate.

In generale comunque la prevalenza di sensibilizzazione oscilla tra il 20 e il 30% nei soggetti allergici alla betulla, alle graminacee e all'ambrosia, mentre potrebbe essere maggiore negli allergici a *Chenopodium album* L. (Amaranthaceae), a *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae) e a *Phoenix dactylifera* L. (o palma da dattero, Arecaceae).

Poiché le profiline sono presenti nei pollini di numerose piante, ma anche in numerosi alimenti di origine vegetale, lo sviluppo di una sensibilizzazione allergica verso una profilina comporta, a causa della elevata similitudine tra le diverse profiline, la frequente insorgenza di cross-reattività tra diversi inalanti e tra inalanti ed alimenti.

Un ulteriore gruppo di proteine, le taumatine, possono essere associate alle sindromi allergiche. La taumatina è una proteina con un intenso gusto dolce, origina 'dalla specie arbustiva africana *Thaumatococcus daniellii* (Benn.) Benth. ex Eichler. In base alla omologia di sequenza con questa proteina, tutte le proteine PR-5 sono state designate Thaumatin-like proteins (TLPs). Sebbene nessuna delle varie proteine sono state descritte aver un gusto dolce.

Non si riscontrano livelli rappresentativi di TLPs nelle piante giovani, in quanto vengono indotte esclusivamente in risposta a ferite o attacchi di agenti patogeni. Pur non essendo conosciuta in gran parte delle TLPs una specifica funzione, certamente esse sono implicate nella Resistenza Sistemica Acquisita (RSA) e nella risposta a stress biotici, inducendo l'interruzione di crescita delle ife e la riduzione della germinazione delle spore probabilmente attraverso un meccanismo di permeabilizzazione delle membrane attraverso formazione di pori e/o attraverso una interazione con recettori dell'agente patogeno.

La maggioranza di queste proteine ha un P.M. tra 18 e 25 kDa e sono costituite principalmente da beta-foglietti antiparalleli, e stabilizzati da otto ponti disolfuro.

Esse sono poi generalmente resistenti alla degradazione proteolitica, alla denaturazione calorica o dal pH. Nonostante questo, l'ipersensibilità alle TLPs è stata finora associata clinicamente solamente alla sindrome orale allergica.

3.3. Dati epidemiologici

Uno studio statistico condotto dall'ESSCA (European Surveillance System of Contact Allergy) ha rilevato che circa il 20% della popolazione Europea è sensibile al Ni. In particolare, l'Italia è il paese in cui ci sono più soggetti affetti da allergia al Ni (32,1%; F:M range 3:1 - 14:1) (ESSCA Writing Group, 2008). Negli Stati Uniti la popolazione sensibile al Ni è tra il 14 e il 17% (Krob *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2008) ed è in aumento (American Academy of Dermatology, 2015).

Le donne sono più colpite rispetto agli uomini e questo è dovuto al fatto che il Ni è presente nei prodotti cosmetici ed è largamente utilizzato in gioielleria (Garg *et al.*, 2013). Negli

uomini, l'esposizione professionale è il fattore più responsabile per l'aumentata sensibilizzazione al Ni. L'allergia al Ni può svilupparsi a qualsiasi età ma prevale nella terza decade di vita. Una volta sviluppata, persiste per molti anni e spesso per tutta la vita (Pizzutelli, 2011).

L'implementazione di misure preventive con un approccio integrato sulle allergie alimentari ed intolleranze permette di ridurre del 90% gli accessi al Pronto soccorso con ricadute importanti sulla salute delle persone e sul risparmio di costi pubblici sanitari (Minale *et al.*, 2016), considerato che un costo medio per ciascun accesso al Pronto Soccorso per anafilassi è stato calcolato non meno di 500 euro (Ministero della Salute, 2007)

La tossicità riproduttiva e dello sviluppo negli animali da sperimentazione è stata selezionata come effetto critico per la valutazione degli effetti cronici di Ni. La dermatite (SCD) nei soggetti sensibili al Ni dopo l'esposizione orale è stata selezionata invece come effetto critico adatto alla valutazione degli effetti acuti di Ni. Un BMDL10 (limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% relativo alla dose di riferimento associata ad una risposta del 10% dell'effetto) inferiore di 1,1 µg Ni/kg b.w. è stato individuato quale livello di rischio per l'incidenza di SCD dopo l'esposizione orale a Ni di volontari umani. Il panel CONTAM ha applicato un margine di esposizione (MOE) di 10 come indicativo di una preoccupazione di effetti sulla salute. Anche se basata su dati di consumo limitati, l'esposizione alimentare a Ni della popolazione vegetariana riportata nel suddetto parere sembra essere leggermente superiore a quello stimato per la popolazione generale, con una stima di 7,1 µg Ni/kg b.w. al giorno. Pertanto, il livello di preoccupazione già espressa per l'esposizione a Ni per la popolazione generale è tanto maggiore per la popolazione vegetariana.

Studi su pazienti pediatrici hanno evidenziato una maggiore incidenza nelle femmine, probabilmente per sensibilizzazione da uso precoce di orecchini. Infatti, in Svezia su 2.285 patch test in adolescenti 16enni ha evidenziato il 15,3% patch positive con una suddivisione fra i sessi F:M 17% vs 13,4% (Institute of Environmental Medicine, Stockholm Sweden). Inoltre, da studi condotti dal Wenner-Gren Institute for Experimental Biology, University of Stockholm emergerebbe che l'allergia al Ni è prevalente in pazienti con Lupus Eritematoso Sistemico, artrite reumatoide, sindrome di Sjogren.

In Liguria, da indagini condotte da Policlinico IRCCS San Martino dal 2011 al 2017, eseguendo 3.000 patch test, 1.000 sono risultati positivi al Ni (Minale *et al.*, 2016).

4. OBIETTIVI E FASI DELLA RICERCA

Obiettivi della ricerca sono stati: 1) identificare genotipi di pomodoro, maggiormente utilizzati in Liguria, a minor accumulo di Ni nel frutto; 2) individuare le condizioni per la coltivazione che riducano l'uptake del metallo nella pianta; 3) valutare il potenziale allergenico dei frutti così ottenuti.

Pertanto, partendo dalla individuazione dei genotipi più utilizzati per il consumo del prodotto crudo (pomodoro da insalata) o semilavorato per successiva cottura (inscatolato) in Liguria, sono stati inizialmente eseguiti in laboratorio test di germinazione ed allungamento radicale condotti *in vitro* in camera di crescita su alcuni dei suddetti genotipi a diverse somministrazioni di Ni, al fine di valutare l'effetto fitotossico del metallo nelle fasi precoci di sviluppo della plantula.

Sulle stesse cultivar sono stati condotti successivamente esperimenti di coltivazione in serra su suoli addizionati di Ni in condizioni controllate, valutandone il comportamento di accumulo e le risposte, al variare della concentrazione di Ni nel terreno, in termini di concentrazione nei frutti ed effetti sulla biomassa delle piante. A tal fine si sono avviate collaborazioni con il laboratorio di analisi mineralogiche del DISTAV e di Geospectra s.r.l., spin off dell'Università di Genova, per sperimentare anche tecniche analitiche speditive per la ricerca di Ni nei terreni e nei pomodori, attraverso comparazioni metodologiche e tecnologiche diverse. Successivamente sulle stesse cultivar maggiormente utilizzate in Liguria si sono valutate in campo le condizioni colturali migliori per limitare la presenza e la captazione di Ni.

Successivamente, grazie alla collaborazione con l'Istituto di Bioscienze e Biorisorse del CNR di Napoli, sui frutti ottenuti, oltre a valutare i contenuti di Ni, si sono quantificate le LTP prodotte dalle piante nelle diverse condizioni colturali. Infine, grazie alla collaborazione con personale medico dei CAAM (Centri Associati di Allergologia Molecolare), i frutti di pomodoro a basso livello di Ni ottenuti dal processo, sono stati testati su siero umano di allergici specifici al fine di valutarne le diverse risposte anticorpali.

È risaputo che diversi fattori, tra cui la cultivar, la fase di maturazione, i trattamenti fitosanitari, la composizione del suolo e le condizioni ambientali, influiscono sulla qualità nutrizionale degli alimenti vegetali, nonché sulla quantità e sul profilo degli allergeni (Ciardiello *et al.*, 2009; Pasquariello *et al.*, 2012; Tuppo *et al.*, 2018). Tuttavia, una possibile influenza del Ni sulla quantità di proteine allergeniche nelle fonti di allergia alle piante non è stata finora approfonditamente studiata. Tra gli allergeni di pomodoro, particolare attenzione dovrebbe essere riservata a LTP poiché la sua ingestione, inalazione e il contatto con essa può causare sintomi che possono includere tutti i livelli di gravità clinica delle reazioni allergiche: sindrome da allergia orale (OAS), sintomi gastrointestinali, sindrome da orticaria-angioedema, anafilassi

indotta dall'esercizio alimentare e persino shock anafilattico (Fernandez-Rivas *et al.*, 2006; Romano *et al.*, 2012).

5. MATERIALI E METODI

5.1 Scelta delle cultivar di pomodoro

Negli esperimenti è stato utilizzato *Solanum lycopersicum* L. (Cuore di Bue Group).

Nel corso dei secoli, *S. lycopersicum* ha subito numerosi incroci da parte di agricoltori intenzionati a selezionare piante con bacche più grandi e appetibili. Questo ha portato alla formazione di numerose cultivar¹ ufficialmente registrate nel database della European Commission (s.d.). Tuttavia, molte cultivar del passato sono state sostituite da ibridi INGRID che presentano le più svariate caratteristiche, come ad esempio, la resistenza ai patogeni, il miglior adattamento a condizioni pedo-climatiche, ecc.

In Liguria, il pomodoro “Cuore di Bue” è rilevante, tanto da venir elencato da diversi anni e anche recentemente tra i Prodotti Agroalimentari Tradizionali italiani (MIPAAF, 2020); esso è adatto al consumo fresco (pomodoro da mensa) ed è caratterizzato da pregiate proprietà sensoriali del frutto.

Le piante e i semi sono stati acquistati nell'azienda Agricola Anselmo Cassani con sede ad Albenga, vivaio specializzato in piante orticole. Il 70% della produzione ligure è rappresentata dal pomodoro Cuore di Bue coltivato in 9 differenti cultivar: *Solanum lycopersicum* (Cuor di Bue Group) ‘Gigawak’, ‘Rugantino’, ‘Tomawak’, ‘Arawak’, ‘Ingrid’, ‘Gotico’, ‘Deko’, ‘Levante’ e ‘Standard’, ottenuti da seme o innestati. Per la produzione da seme, i semi sono fatti germinare in cella di germinazione a temperatura ed umidità relative controllate e le plantule ottenute sono trasferite in serra per la vendita delle piante in cubetto.

5.2 Resistenza del pomodoro al Nichel: test in microcosmo

La prima fase della sperimentazione è stata condotta presso il laboratorio di Biologia Vegetale del Dipartimento di Scienze della Terra, dell’Ambiente e della Vita (DISTAV) e ha previsto di valutare la fitotossicità del Ni mediante i test di germinazione e allungamento radicale utilizzando semi di *S. lycopersicum* delle cultivar (Cuor di Bue Group) ‘Standard’ (denominata STANDARD o WT) e *S. lycopersicum* (Cuor di Bue Group) ‘Rugantino’ (denominata RUGANTINO o F1)

¹ Secondo l'International Code of Nomenclature for Cultivated Plants (ICNCP) la “cultivar” è definita come “insieme di piante, selezionato per un particolare carattere o combinazione di caratteri e chiaramente distinto, uniforme e stabile in questi caratteri, che mantiene quando propagato con mezzi appropriati”. Lo stesso ICNCP definisce inoltre col termine “Group” la categoria formale che comprende un “insieme di cultivar, piante singole o insieme di piante, con una somiglianza definita” (Brickell *et al.*, 2009).

5.2.1 Standard internazionali e requisiti per lo svolgimento del test

Il criterio principale per individuare le specie idonee ai test ecotossicologici è la crescita rapida delle plantule su una matrice test, in condizioni ambientali controllate. La replicabilità e l'omogeneità dei risultati sono tra le caratteristiche fondamentali di un test ecotossicologico (ISO 11269-1:2012). Questo metodo confronta l'allungamento della radice delle piante superiori (spermatofite) in un terreno di prova o su carta e/o di una serie di diluizioni rispetto ad un suolo controllo.

I semi pre-germinati vengono esposti sulla carta in condizioni controllate. Dopo il periodo di crescita, le lunghezze delle radici delle piante test sono confrontate con quelle delle piante controllo. Differenze statisticamente significative nelle lunghezze delle radici delle piante cresciute in qualsiasi mezzo di prova rispetto ai controlli sono indicative di un effetto.

La durata del test su varietà orticole è stata di 6 giorni comprensivi della pregerminazione (ISO 11269-1:2012). Test di fitotossicità con effetti acuti e cronici hanno obiettivi differenti e solitamente vengono svolti preliminarmente i test con effetti acuti, che forniscono valori quali LC₅₀ e EC₅₀, utili per avere un'informazione sulla tossicità della sostanza in esame.

5.2.2. Specie test

S. lycopersicum è generalmente impiegato per i test ecotossicologici (ISO 11269-1:2012; OECD 208, 2006) che raccomandano l'uso di una/due eudicotiledoni (Chase *et al.*, 2016) e di una monocotiledone. Visto l'obiettivo del lavoro è stata usata esclusivamente una dicotiledone.

Le cultivar utilizzate, per quanto desunto dall'analisi in premessa, sono state dunque:

- *S. lycopersicum* (Cuor di Bue Group) 'Standard'
- *S. lycopersicum* (Cuor di Bue Group) 'Rugantino'

5.2.3 Sterilizzazione e imbibizione

Al fine di prevenire la contaminazione fungina, i semi sono stati sottoposti a sterilizzazione con NaClO 10% 10' e in seguito svolti 3 cicli di lavaggio di 1' con acqua deionizzata.

Successivamente i semi sono stati imbibiti per 24 h su carta da germinazione in piastre Petri, 20°C al buio.

5.2.4 Preparazione delle soluzioni da testare

La somministrazione di Ni è avvenuta sotto forma di solfato di Ni esaidrato ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma) alle concentrazioni di: 0, 30, 60, 120, 300 mg/kg, da intendersi come concentrazioni effettive, disponibili per i semi. Il sale è stato sciolto in acqua deionizzata sterile e portato a pH 6.00 (KOH).

Le concentrazioni sono state scelte sulla base della bibliografia disponibile (Albanese *et al.*, 2015) e dei limiti di legge (D.lgs 152/2006):

- Concentrazione di Ni nei siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale: 120 mg/kg
- Concentrazione di Ni nei siti ad uso commerciale e industriale: 500 mg/kg

5.2.5 Allestimento del test

I test di germinazione sono stati eseguiti in piastre Petri di diametro 9 cm utilizzando due dischi di carta bibula imbibiti con 4 ml di soluzione. Il disegno sperimentale prevede:

- 5 concentrazioni (controllo compreso)
- 20 repliche per concentrazione
- 10 semi per piastra

Quindi sono stati utilizzati un totale di 1000 semi per ogni genotipo, ad ogni test.

Il test di fitotossicità è stato allestito seguendo la procedura riportata di seguito:

- Imbibizione della carta bibula con la soluzione di Ni
- Semina di 10 semi per ogni Petri
- Petri sigillate con pellicola di cera (parafilm)
- Piastre poste in camera di incubazione a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ al buio
- Incubazione 4 giorni con fotoperiodo 12/12

5.2.6 Parametri registrati

Si considerano germinati i semi che al termine dell'esposizione presentano un apparato radicale visibile della lunghezza di 5 mm. La misura della lunghezza radicale è particolarmente significativa visto che la radice è il primo organo che si sviluppa nella plantula.

Le misure vengono effettuate ponendo le plantule su carta millimetrata (fig. 4). La misura viene registrata in mm. Il primo parametro che viene calcolato è l'indice di germinazione (ottenuto dalla media dei semi germinati al termine del test per la media dell'allungamento

radicale), tale parametro mostra la percentuale di germinati nei campioni test a confronto con i germinati del controllo, in forma percentuale e si calcola tramite la seguente formula:

$$IG\% = (Gt \times Lt) / (Gc \times Lc) \times 100$$

Dove:

Gt: n° medio di semi germinati nel campione trattato

Gc: n° medio di semi germinati nel controllo

Lt: lunghezza radicale media nel campione trattato (mm)

Lc: lunghezza radicale media nel controllo (mm)

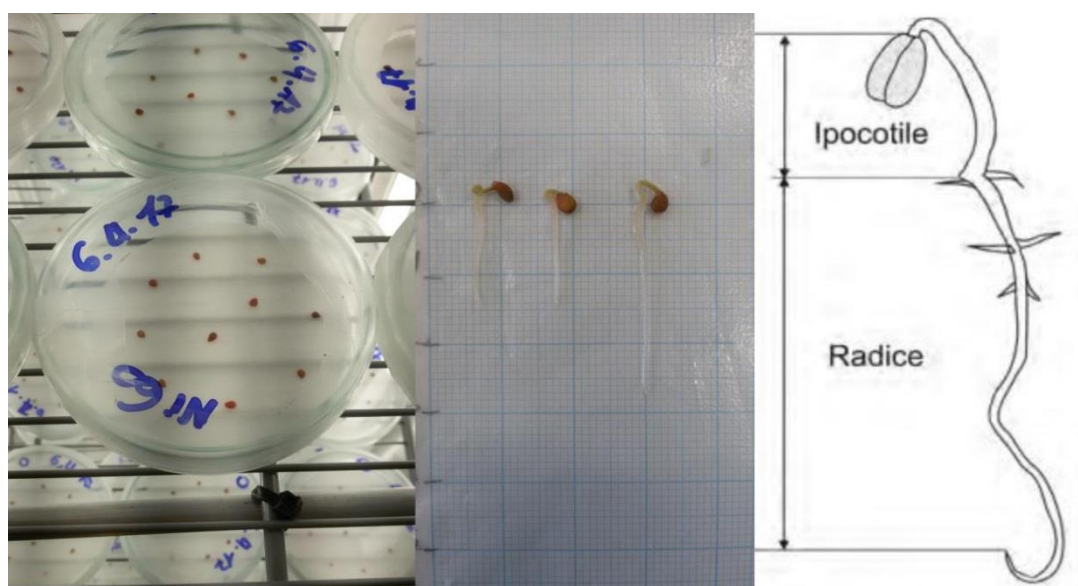


Figura 4 – Semi posti a germinare in piastre Petri all'interno della fotocamera (sinistra); misurazione delle radici su carta millimetrata (centro); schema APAT (2004) per la misura delle radici delle dicotiledoni (destra).

5.3. L'impatto del Ni sulla produzione di biomassa e sulla fruttificazione: test in mesocosmo

5.3.1 Preparazione del test e disegno sperimentale

La fase successiva ai test di fitotossicità è stata condotta nella serra sperimentale dell'Orto Botanico dell'Università di Genova ed è consistita nella coltivazione di 50 piante di *S. lycopersicum* fino al raggiungimento della maturazione dei frutti, al fine di valutare il bioaccumulo di Ni nei frutti e nelle piante.

Sono state acquistate 25 piante di *S. lycopersicum* (Cuor di Bue group) 'Standard' e 25 piante di (Cuor di Bue Group) 'Ingrid' innestato 'Beaufort' di circa 3 mesi e 20 cm di altezza, che non presentavano alcun segno di appassimento fogliare, necrosi, clorosi, o infestazione da patogeni.

Inizialmente, le piante sono state mantenute in vasi da 10 cm di diametro all'interno di una fitocamera riscaldata alla temperatura di $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperiodo 12/12; successivamente sono state rinvasate in vasi da 18 cm di diametro e poste all'interno di una serra ad una distanza di 50 cm l'una dall'altra (fig. 5). Per il substrato di crescita è stato scelto un mix di torba irlandese e sabbia (1:2); il substrato è stato autoclavato a 120°C per 20', e successivamente asciugato in forno a 60°C . Il pH finale del substrato è stato misurato con un pHmetro (pH 210, Hanna Instruments) mescolando una aliquota di terreno con acqua deionizzata (rapporto 1:3). Per determinare la capacità di tenuta dell'acqua (WHC), il suolo è stato trasferito in un becker di diametro 10 cm, sono stati aggiunti 100 ml di acqua a 100 ml di terreno asciutto posto in un imbuto su un cilindro graduato. Dopo aver atteso almeno 1 ora fino all'ultima goccia, il WHC (%) è stato calcolato in base al volume d'acqua trattenuto dal suolo.

Il fatto di utilizzare un substrato contenente in larga parte del materiale inerte è utile nella sperimentazione di sostanze chimiche o quando si desidera minimizzare la variabilità dei suoli naturali e aumentare la comparabilità dei risultati. Materiali inerti come la sabbia riducono al minimo l'interazione con la sostanza in esame (OECD 208, 2006), lasciandola quindi più biodisponibile.

Per valutare la risposta dell'impianto all'aumento della concentrazione di Ni, il suolo è stato idratato omogeneamente con una soluzione di acqua sterile deionizzata e sale metallico ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), a concentrazioni crescenti di Ni: 0, 30, 60, 120, 300 mg/kg in vaso, rispettivamente. Le concentrazioni di Ni sono state scelte sulla base di un'indagine sui dati della letteratura e sui limiti di legge per il Ni nel suolo, come normato dal diritto europeo e italiano (direttiva del Consiglio 86/278/CEE 1986; D.Lgs. 152/2006).

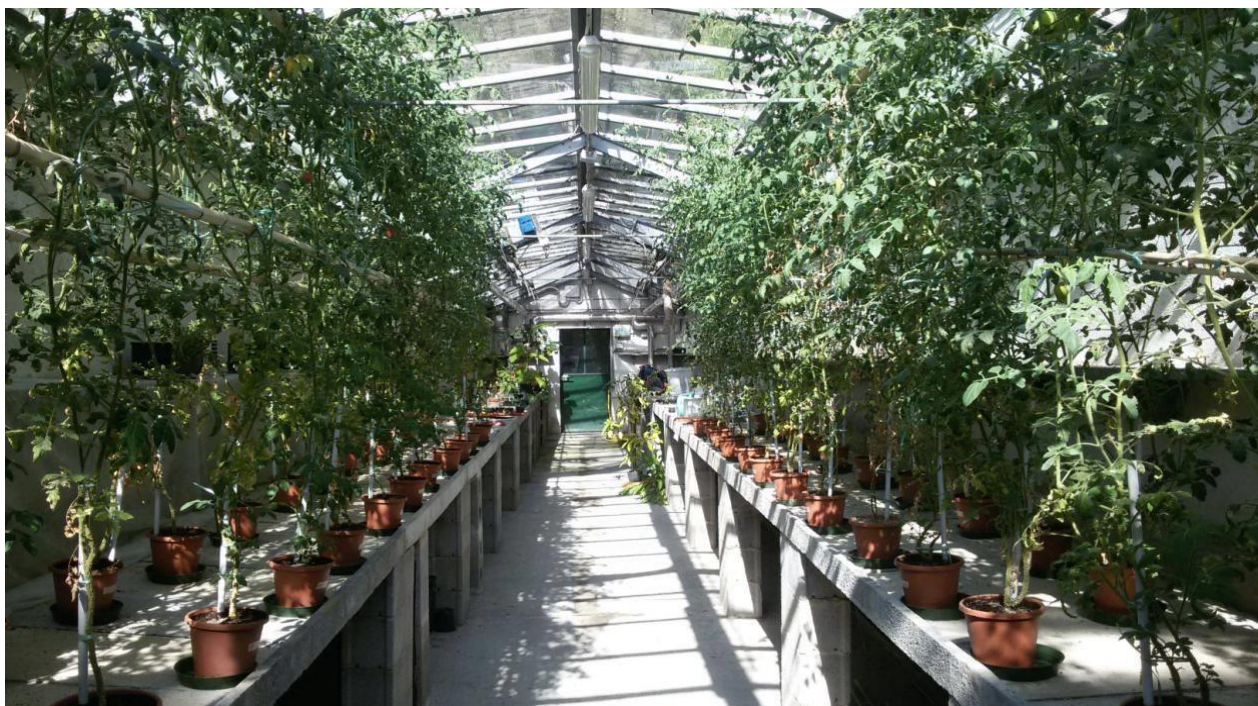


Figura 5 – Piante di pomodoro coltivate all'interno della serra sperimentale dell'Orto Botanico di Genova.

5.3.2 La coltivazione delle piante

Le piantine sono state coltivate a temperatura controllata ($T=21-27^{\circ}\text{C}$) per 240 giorni, irrigando le piante con acqua di rubinetto per mantenere il 70% WHC e monitorando la fenologia e la crescita delle piante due-tre volte alla settimana. Ogni pianta in vaso è stata dotata di un sottovaso per recuperare l'acqua di drenaggio. La coltura protetta consente di utilizzare il fotoperiodo naturale mantenendo condizioni controllate di idratazione del suolo e di temperatura, riducendo quindi il rischio che si manifestino fitopatologie.

Oltre alla radiazione solare, si è utilizzato anche un supporto luminoso dato da luci al neon Philips TL-D 36W/865 Super 80 con fotoperiodo 12/12.

Per favorire la crescita verticale delle piante di pomodoro è stato realizzato un sistema di supporti a cui legare volta per volta i fusti in crescita.

L'irrigazione avveniva tre volte a settimana, con 600 ml di acqua di rubinetto. La fertilizzazione avveniva una volta a settimana con del concime N-P-K (Leader 20-10-20) in forma salina diluito ad una concentrazione di 4 g/l.

L'impollinazione è stata agevolata manualmente. Infine, per evitare l'infestazione da patogeni sono stati utilizzati i seguenti prodotti fitosanitari: Acarin, acaricida liquido

emulsionabile somministrato alla concentrazione di 2 ml/L; Confidor 200 SL, insetticida sistemico somministrato alla concentrazione di 5 ml/L.

5.3.3 Registrazione della fruttificazione

Nei giorni in cui si irrigavano le piante venivano anche monitorati i frutti, ovvero si contava il numero di verdi in formazione e di rossi in maturazione, che ogni singola pianta aveva. Quando un frutto presentava un colore rosso, corrispondente allo stadio di massima maturazione secondo El Hariri *et al.* (2015) e proprietà meccaniche (elasticità, forza di rottura, tenacità e deformazione al punto di rottura), manualmente testate, corrispondenti allo stadio maturo secondo Sirisomboon *et al.* (2012), allora veniva raccolto, siglato e portato in laboratorio

5.3.4 Registrazione delle biomasse

Alla fine dell'esperimento, i campioni di piante sono stati accuratamente sciacquati, prima con acqua di rubinetto e poi con acqua deionizzata. Le radici sono state poste in un setaccio per raccogliere anche le radici fini e lavate con cura con acqua di rubinetto. Le restanti particelle di substrato sono state rimosse con una pinzetta, dopo di che le radici sono state lavate con acqua deionizzata. Le foglie e le radici sono state separate dai fusti, ogni organo vegetale è stato pesato per valutare la biomassa fresca. I frutti sono stati raccolti a stesso grado di maturazione, pesati a fresco e a secco, dopo essiccazione in becker in stufa a 60° C per 6 giorni e analizzati per il contenuto in metalli pesanti. Oltre ai frutti, a fine ciclo, la biomassa di ciascuna pianta è stata raccolta e caratterizzata, così come il terreno di crescita, e anch'essi sottoposti a caratterizzazione chimica in particolare per il contenuto di metalli e metalloidi, di cui sono stati considerati i dati relativi al Nichel.

5.4. Colture di pomodoro Ni-free fuori suolo presso un'azienda agricola

Sono state condotte quattro campagne di sperimentazioni (2 cicli estivi di coltivazioni con semina a dicembre e raccolta a giugno e 2 cicli autunnali, con semina ad agosto e raccolta a dicembre) presso un'azienda agricola di pomodori ad uso commerciale sita sul territorio di Albenga (Savona), che utilizza le medesime varietà di pomodoro, provenienti da piante innestate da medesimo vivaio, già sperimentate in test in microcosmo ed in mesocosmo come descritte nei paragrafi precedenti.

L'azienda produce pomodoro da mensa, utilizzando tecnica di coltivazione fuori suolo in serra.

Il substrato di coltivazione è in fibra di cocco, derivante da prodotto commerciale, al quale viene aggiunta una soluzione di fertirrigazione, a goccia standardizzata, che è stata analizzata e

caratterizzata nel contenuto di Ni, così come i substrati di crescita, presso laboratorio accreditato ufficiale (Laboratorio Regionale Analisi Terreni e Produzioni Vegetali di Sarzana) che ha eseguito l'analisi con metodo ufficiale D.M. 23/03/2000 sulle soluzioni di fertirrigazione per il substrato di crescita.

Le condizioni di fertirrigazione sono state registrate in continuo in termini di contenuto di acqua e nutrienti, al fine di mantenerne la standardizzazione. I trattamenti fitosanitari sono stati registrati su apposito registro di legge ed analizzati al fine di verificare eventuali variazioni fra i diversi cicli.

I pomodori, raccolti al termine dei cicli di coltivazione, sono stati analizzati per la ricerca di Ni analogamente ai pomodori sottoposti al test in mesocosmo di cui ai paragrafi precedenti.

5.5 Metodologia di determinazione del nichel nei pomodori e nei suoli

I campioni secchi sia di suolo sia dei frutti, derivanti sia dalla fase di sperimentazione in mesocosmo sia dalla coltivazione in azienda agricola, dopo aver subito il processo di raccolta ed essiccazione descritta nei paragrafi precedenti, sono stati ridotti in polvere utilizzando un mulino a sfere (Retsch MM2000, Haan, Germania), per essere avviati ad analisi XRF. Il rapporto radice/foglie per la biomassa fresca e secca e il contenuto di acqua (100 - DW/FW) in radice, fusto e foglie sono stati calcolati per valutarne il contenuto idrico (Roccotiello *et al.* 2016)

La caratterizzazione chimica è stata effettuata su campioni di piante essiccate e terreni secchi sulla frazione granulometrica di 2 mm utilizzando uno spettrometro portatile a raggi X (X-MET7500 FP-EDXRF Analyser, Oxford strumenti) che consente analisi non invasive e non distruttive, fornendo informazioni sulla composizione chimica dei suoli e dei campioni vegetali. Le analisi quantitative sono state ottenute dal livello di traccia (ppm) al 100% per gli elementi con numero atomico 12 e il livello di qualità dei dati delle analisi è stato definito secondo il metodo 6200 dell'Agenzia statunitense per la protezione dell'ambiente (EPA, 2007). Questa procedura è stata eseguita grazie alla collaborazione con Geospectra s.r.l, spin-off dell'Università di Genova. Rappresenta un approccio efficiente e alternativo all'analisi di laboratorio tradizionale, consentendo la misurazione della concentrazione di una vasta gamma di elementi chimici, come attestato dalle 15 analisi condotte mediante ICP-MS (Inductively Coupled PlasmaMass Spectrometry) presso il laboratorio Leochimica s.r.l. (Zoppola, Pn), che hanno permesso il controllo e la taratura dello spettrofotometro XRF portando il limite di rilevabilità per il Ni a 0.1 mg/kg.

5.5.1. Analisi elementare mediante spettrofotometria EDXRF

Ciascun campione già essiccato e polverizzato, è stato inserito in appositi portacampione (XRF Sample Cup – Chemplex CAT.NO:1430) opportunamente sigillati con una pellicola idonea all'analisi XRF (Poly-MHP – High Performance XRF Sample Film, Oxford Instruments, PartNo. L77).

Le analisi sono state eseguite (effettuando 3 repliche su ciascun campione) mediante FP-EDXRF utilizzando le seguenti condizioni analitiche: i) tempo di acquisizione = 120 secondi; ii) X-ray energy: 13 e 25 kV; iii) Detector: Large area Silicon Drift (SDD); iv) limite di rivelabilità strumentale: 0,2 mg/kg; limite di rivelabilità calcolato: 0,1 mg/kg.

È stata effettuata un'analisi preliminare semi-quantitativa su tutti i campioni utilizzando la standardizzazione interna dello strumento (Fundamental Parameter Calibration).

Successivamente, è stata effettuata l'analisi quantitativa con standardizzazione esterna, mediante regressione lineare, utilizzando come standard esterni i risultati delle analisi effettuate mediante ICP-MS su campioni selezionati in base alle concentrazioni di Ni risultanti dalle analisi preliminari.

5.5.2 Analisi elementare di controllo mediante ICP-MS

Per le analisi ICP-MS sono state utilizzate le seguenti condizioni analitiche:

- i) campioni di terreno: metodi EPA 3050B 1996 + EPA 6020B 2014 con limite di rilevabilità pari a 0,5 mg/kg; Il metodo EPA 3050B 1996 prevede la preparazione del campione tramite "digestione" ottenuta su 1 g di materiale con aggiunta di acido nitrico (HNO₃) e perossido di idrogeno (H₂O₂);
- ii) campioni di pomodoro: metodi UNI EN 13805:2014 + UNI EN 15763:2010 con limite di rilevabilità pari a 0,01 mg/kg. Il metodo UNI EN 13805:2014 prevede l'individuazione di metalli in prodotti alimentari tramite digestione acida sotto pressione.

5.6. Determinazione delle proteine allergeniche nei frutti di pomodoro

Le attività di seguito riportate sono state svolte grazie alla collaborazione con l'Istituto di Bioscienze e Biorisorse del CNR di Napoli e con personale medico dei CAAM.

5.6.1. Preparazione di estratti proteici e frazioni separate

Gli estratti proteici sono stati preparati da ogni campione di pomodoro utilizzando una procedura che mostra una buona efficienza nell'estrazione delle proteine dai frutti (Ciardiello *et al.*, 2009). In breve, ogni campione di pomodoro è stato omogeneizzato dopo l'aggiunta di 0,5 M NaCl (1:1 w: v). Dopo aver mescolato per 2 h in un bagno d'acqua con ghiaccio, il campione è

stato centrifugato a 10400 x g per 1 h. Il surnatante, che rappresenta l'estratto totale di proteine, è stato raccolto e dializzato con 10 mM Tris-Cl, pH 8.0. Un'aliquota di 1 ml di ogni estratto totale è stata conservata a -20°C e utilizzata per stimare la concentrazione proteica ed eseguire gli esperimenti di inibizione del legame IgE. La quantità rimanente di ogni estratto è stata sottoposta a separazioni cromatografiche per ottenere una frazione arricchita con molecole anioniche. Per raggiungere questo obiettivo, ogni estratto è stato caricato su una colonna DE52 (Whatman, Brentford, Regno Unito), nella stessa soluzione tampone utilizzata per la dialisi. Il flusso è stato raccolto e dializzato con 10 mM NaAc pH 5.0. Per concentrare questa frazione cationica, è stata caricata su una colonna Sp-Sefarosio (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), equilibrata nella stessa soluzione tampone. I componenti legati sono stati eluiti con NaCl 0,5M e le frazioni contenenti le proteine sono state raggruppate. Un volume corrispondente a 1 g di frutta è stato separato da RP-HPLC, su una colonna C8 Vydac (Deerfield, IL, USA) (4,6 x 250 mm), utilizzando un sistema Beckman System Gold (Fullerton, CA, USA). L'eluizione è stata ottenuta attraverso un gradiente lineare multifase di eluente B (0,08% TFA in acetonitrile) nell'eluente A (0,1% TFA) ad una portata di 1 ml/min. L'eluito è stato monitorato a 220 e 280 nm. I picchi di interesse sono stati analizzati attraverso sequenziamento aminoacidico N-terminale.

La concentrazione proteica dell'estratto totale di proteine è stata determinata con il metodo Bradford utilizzando il BIO-RAD Protein Assay (Biorad, Milano, Italia), attraverso una curva di calibrazione realizzata con albumina bovina sierica. Per stimare la quantità di 9k-LTP (Sola I 3) e la proteina taumatina-simile (Sola I TLP) contenuta in ogni campione (espressa come g di proteine per gr di pomodoro fresco), l'area dei picchi RP-HPLC è stata calcolata e confrontata con quella dei picchi ottenuti con una quantità nota di 9k-LTP e TLP del pomodoro, rispettivamente.

5.6.3. Sequenziamento aminoacidico.

Le proteine del sequenziamento degli amminoacidi raccolte da RP-HPLC sono state concentrate con un concentratore di vuoto centrifugo (Savant Speedvac Plus SC110 A, Ramsey, Minnesota, USA). Successivamente, una quantità proteica corrispondente a circa 200 mAU a 220 nm è stata sottoposta a sequenziamento diretto automatico della regione N-terminale con un sequenziatore proteico PPSQ-33B (Shimadzu Corporation, Tokyo, Giappone).

5.6.4. Gli esperimenti di inibizione dell'IgE con il sistema di test FABER®

Il test FABER® è un test sierologico in vitro multiplex che consente il rilevamento di anticorpi IgE che riconoscono specificamente gli allergeni marcati su un biochip (Giangrieco *et al.*, 2019; Tuppo *et al.*, 2018). La versione FABER® utilizzata per eseguire questo studio (FABER 244-122-

122) porta 244 preparati allergenici, vale a dire 122 allergeni purificati e 122 estratti allergici multipli di proteine. Per ottenere informazioni su una possibile variazione del contenuto di allergeni nei campioni di pomodoro trattati con Ni300, rispetto a quelli non trattati, il saggio SPHIAa (Palazzo *et al.*, 2013; Pasquariello *et al.*, 2012) è stato utilizzato con alcune modifiche. In breve, il siero caratterizzato di pazienti sensibilizzati a diversi allergeni alimentari vegetali, compresi quelli che contengono IgE caratteristici per il pomodoro 7k-LTP (Sola l 6) e altri allergeni vegetali, come 9k-LTP, profilins, Bet v 1-like proteine e gibberellin proteine, sono stati selezionati in pool. Successivamente, 0,12 ml del pool dei sieri sono stati co-incubati con 0,12 ml di una soluzione contenente 0,1 mg del campione di estratto di pomodoro. L'inibizione del legame IgE è stata valutata eseguendo il test FABER e registrando il legame IgE residuo sugli allergeni marcati sul biochip. I valori di riferimento per la mancanza di inibizione dell'associazione IgE sono stati ottenuti eseguendo campioni di controllo in cui la soluzione allergene è stata sostituita con sola soluzione tampone. I valori di inibizione sono stati calcolati in tempo reale da una specifica procedura sviluppata all'interno del software InterAll (versione 5.0, ADL s.r.l.).

Il Test Faber è un nuovo strumento per la diagnosi delle allergie il cui marchio è stato registrato presso l'ufficio dell'Unione Europea per la proprietà intellettuale. È stato sviluppato dall'Istituto di Bioscienze e Biorisorse del Consiglio Nazionale delle Ricerche di Napoli (Ibbr-Cnr) e dal CAAM (2018) (Redazione Tecnica Ospedaliera, 2017), grazie all'uso delle nanotecnologie: gli allergeni sono infatti accoppiati a supporti molto piccoli (nanobeads), utilizzando diversi tipi di legami chimici e ottimizzando la coniugazione delle proteine allergeniche con il supporto. È pertanto un test sierologico in vitro multiplex che consente la rilevazione di anticorpi IgE che riconoscono specificamente gli allergeni marcati su un biochip (Giangrieco *et al.*, 2019; Tuppo *et al.*, 2018). Il dispositivo è costituito da un biochip sul quale sono immobilizzate 244 preparazioni allergeniche: 122 molecole e 122 estratti caratterizzati, provenienti da circa 150 differenti fonti allergeniche (alimenti, pollini, acari, epiteli, muffe, lattice, veleni di api e vespe, tessuti), che attraverso un unico test sierologico permettono di analizzare contemporaneamente la sensibilità a tutti gli allergeni. Nella raccolta di preparazioni allergeniche sono presenti componenti esclusivi, realizzati e controllati costantemente dal gruppo IBBR-Cnr, mentre il test, che prevede l'uso di siero o plasma umano e di un anticorpo anti-Immunoglobina E (IgE), viene eseguito dagli allergologi.

5.6.5. Test sierologici

Per eseguire il Single Point Highest Inhibition Achievable assay (SPHIAa) i sieri caratterizzati sono stati selezionati dalla banca dati InterAll (versione 5.0, ADL S.r.l.) che avevano dimostrato di contenere IgE specifiche vincolante dopo il test FABER. Tutti i pazienti hanno dato il loro

consenso informato all'uso dei loro dati clinici per scopi di ricerca in forma anonima. Tenuto conto della natura puramente comparativa di questo studio, insieme al fatto che tutti i prelievi di sangue venoso facevano parte della pratica clinica di routine e che una parte residua del campione di routine è stata utilizzata per esperimenti di inibizione, non si è ritenuta necessaria un'approvazione formale della sperimentazione da parte della Commissione Etica.

Per ottenere informazioni su una possibile variazione del contenuto di allergeni nei campioni di pomodoro trattati con Ni300, rispetto a quelli non trattati, il saggio SPHIAa (Pasquariello *et al.*, 2012; Tuppo *et al.*, 2019) è stato utilizzato con alcune modifiche.

In breve, il siero caratterizzato di pazienti sensibilizzati a diversi allergeni alimentari vegetali, compresi quelli contenenti IgE per gli allergeni del pomodoro 7k-LTP (Sola l 6) e altri allergeni vegetali, come 9k-LTP, profiline, Bet v 1proteine e gibberellina proteine, sono stati selezionati e raggruppati. Successivamente, 0,12 ml di siero sono stati co-incubati con 0,12 ml di una soluzione contenente 0,1 mg del campione di estratto di pomodoro. L'inibizione del legame IgE è stata valutata eseguendo il test FABER e registrando il legame IgE residuo sugli allergeni marcati sul biochip. I valori di riferimento per la mancanza di inibizione dell'associazione IgE sono stati ottenuti eseguendo campioni di controllo in cui la soluzione allergene è stata sostituita solo con soluzione tampone. I valori di inibizione sono stati calcolati in tempo reale da una specifica procedura sviluppata all'interno del software InterAll (versione 5.0, ADL s.r.l.).

5.7. Analisi statistica

Per l'analisi statistica di tutti i principali parametri in risposta allo stress da Ni nelle prime fasi di germinazione ed allungamento radicale (lunghezze radicali, del tasso di germinazione e dell'indice di germinazione) e per tutti i parametri relativi allo sviluppo di biomassa vegetativa e dei frutti nelle piante adulte (biomassa fresca e secca ipogea ed epigea, fruttificazione, peso medio dei frutti maturi e non, ecc.) è stato utilizzato inizialmente il pacchetto statistico di Excel (Office 2007). I dati con distribuzione normale sono presentati come medie \pm deviazione standard (DS).

Successivamente sui risultati degli esperimenti condotti in serra ed in azienda agricola sono state eseguite analisi statistiche con il software Statistica 8.0 (Statsoft Inc.). I risultati al di sotto dei limiti di rilevabilità sono presentati come zero e sono stati utilizzati come tali nei calcoli. Poiché la maggioranza dei parametri ottenuti dalla sperimentazione in serra hanno distribuzione non normale, Sono stati utilizzati test non parametrici per evitare la trasformazione dei dati. La normalità dei parametri è stata valutata con il test Shapiro-Wilk. Le correlazioni tra le variabili sono state analizzate utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman (ρ) usando $P < 0,05$ per indicare la significatività statistica. Il test a due campioni

Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per valutare le differenze tra il controllo e i trattamenti Ni.

Le analisi parametriche sono state utilizzate per valutare il Ni nel frutto e nel suolo rispetto alla produzione di proteine allergeniche. La sostanza secca (DM%), definita come il peso secco del frutto (DW)/ peso fresco frutto (FW) - 100 (Kumar *et al.*, 2015; Migliori *et al.*, 2017; Papadaki *et al.*, 2017) è stato anche calcolato per le altre parti vegetali per valutare la produzione complessiva di biomassa vegetale in risposta a uno stress abiotico come nel caso del Ni del suolo. Il software GraphPad Prism è stato utilizzato per la rappresentazione grafica dei dati di concentrazione delle proteine, del contenuto LTP e TLP e dei risultati dell'inibizione di IgE.

6. RISULTATI

6.1 Test in microcosmo sulla resistenza del pomodoro al Nichel

I risultati dei due test di fitotossicità su piante di *S. lycopersicum* (fig. 6) condotti su 1.500 semi per i due genotipi (3.000 semi totali) hanno evidenziato una risposta di fitotossicità dose-dipendente da parte del Ni presente nel substrato di crescita (carta bibula). sulla germinazione dei semi di entrambe le varietà, con risposta più accentuata per il genotipo STANDARD rispetto al genotipo RUGANTINO.

Complessivamente, la lunghezza radicale decresce all'aumentare della concentrazione di Ni, con differenze statisticamente significative alla concentrazione di 300 mg/kg per entrambe le cultivar considerate. Anche l'indice di germinazione decresce all'aumentare delle concentrazioni di Ni. Valutando l'indice di germinazione, l' EC_{50} , ovvero la concentrazione alla quale si ha un effetto del 50% rispetto al totale, per le due cultivar testate, risulta differente, con valori di Ni pari a 30 mg/kg per STANDARD e tra 30 e 60 mg/kg per RUGANTINO.

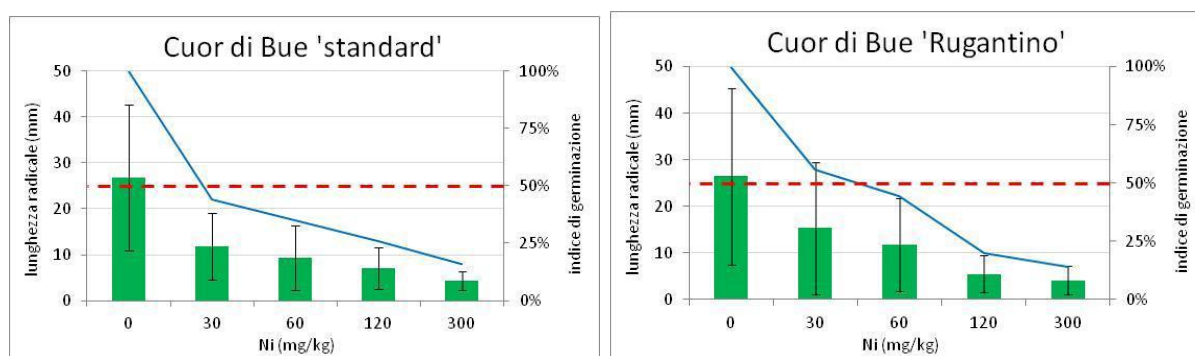


Figura 6 - Lunghezza radicale media (istogrammi) e indice di germinazione (linea blu); in rosso la soglia dell' EC_{50} . N = 1000 semi per cultivar 'standard' (a) e 'Rugantino' (b).

6.2 Impatto sulla produzione di biomassa e sulla fruttificazione in coltivazione di pomodoro in mesocosmo su suoli a diverse concentrazioni di nichel

6.2.1 Concentrazione del nichel nei suoli

Premesso che nel terreno di coltura non addizionato di Ni solfato esaidrato, utilizzato come Controllo, il Ni è stato riscontrato comunque naturalmente presente in una concentrazione di 32 mg/kg. Analizzando i contenuti di Ni presenti nella torba e nella sabbia utilizzata per la preparazione del suolo di coltivazione utilizzato per gli esperimenti si è rinvenuto che il contenuto di Ni è prevalentemente ascrivibile alla frazione sabbiosa (Tab. 3).

substrato	Ni (mg/kg)
torba	n.d.
sabbia	47
sabbia+torba	32

Tabella 3. Contenuto di Ni in torba, sabbia e in mix 2:1.

Pertanto, i trattamenti indicati con Ni 30, 60, 120 e 300 sono da intendersi con aggiunta di Ni solfato esaidrato in concentrazione pari a 30 mg/kg, 60 mg/kg, 120 mg/kg e 300 mg/kg al suolo in aggiunta a quella di fondo già presente naturalmente nel terreno di coltivazione utilizzato per il controllo.

I contenuti di Ni riscontrati nei rispettivi suoli, addizionati di Ni secondo quanto riportato nel capitolo 5, al termine dell'esperimento sono riportati in figura 7.

Si è riscontrato un incremento di Ni per trattamento, ma con concentrazioni finali nello stesso ordine di grandezza nonostante le concentrazioni iniziali fossero fino ad un ordine di grandezza superiori.

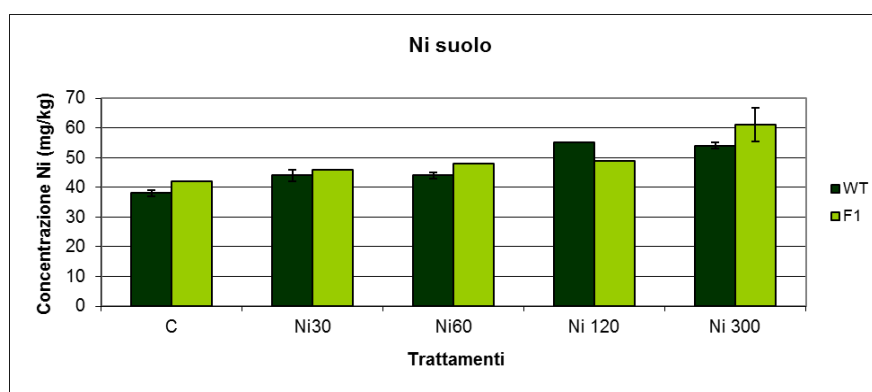


Figura 7 - Contenuto di Ni nei suoli a fine trattamento dei pomodori suddivisi per cultivar (Standard -WT e Ingrid- F1)

Considerando le perdite relative nel suolo risulta evidente che al termine della sperimentazione un'aliquota significativa del Ni aggiunto come NiSO₄ 6H₂O è stata persa dal suolo. La perdita

relativa nel suolo aumenta in modo lineare (Fig. 7 a) passando dalle aggiunte più basse (Ni30) verso quelle più alte (Ni300). In qualunque caso è evidente tuttavia che la concentrazione finale di Ni nel suolo è sempre più elevata del valore di background del substrato iniziale.

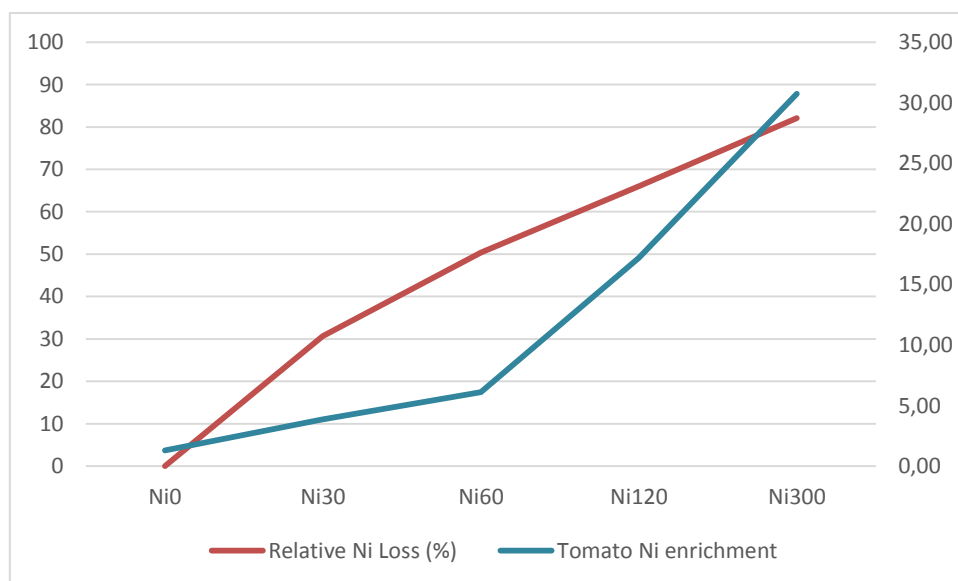


Fig. 7 a - Perdita relativa di Ni (%) nei suoli con aggiunta di Ni e valori di Ni nei frutti di pomodoro al termine del ciclo di coltivazione (mg/kg DW).

6.2.2. Fruttificazione

Il numero di pomodori raccolti nell'esperimento in serra è sintetizzato in tabella 4.

In generale, la cultivar Cuor di Bue 'Standard' ha prodotto un maggior numero di frutti rispetto alla cultivar 'Ingrid'. Analizzando la fruttificazione rispetto all'aumento della concentrazione di Ni nel substrato di coltivazione si ha avuto una diminuzione del numero di frutti prodotti in valore assoluto rispetto al controllo quando il trattamento con Ni è pari a 300 mg/kg per la cultivar 'Standard', mentre nella 'Ingrid' si ha un lieve aumento.

Concentrazioni	ROSSI		VERDI		TOTALI	
	Standard	Ingrid	Standard	Ingrid	Standard	Ingrid
C	22	17	20	8	42	25
Ni 30	17	4	15	6	32	10
Ni 60	10	8	21	10	31	18
Ni 120	23	9	33	3	56	12
Ni 300	13	11	11	19	24	30

Tabella 4. Numero di frutti prodotti in base a cultivar, grado di maturazione e concentrazione di Ni (mg/kg) somministrato.

Tuttavia, calcolando la produzione media di frutti maturi per pianta, la cultivar ‘Ingrid’ ha un numero medio di frutti inferiore rispetto alla ‘Standard’ se sottoposta a Ni 300 mg/kg. Questa differenza però non è statisticamente significativa (fig. 8).

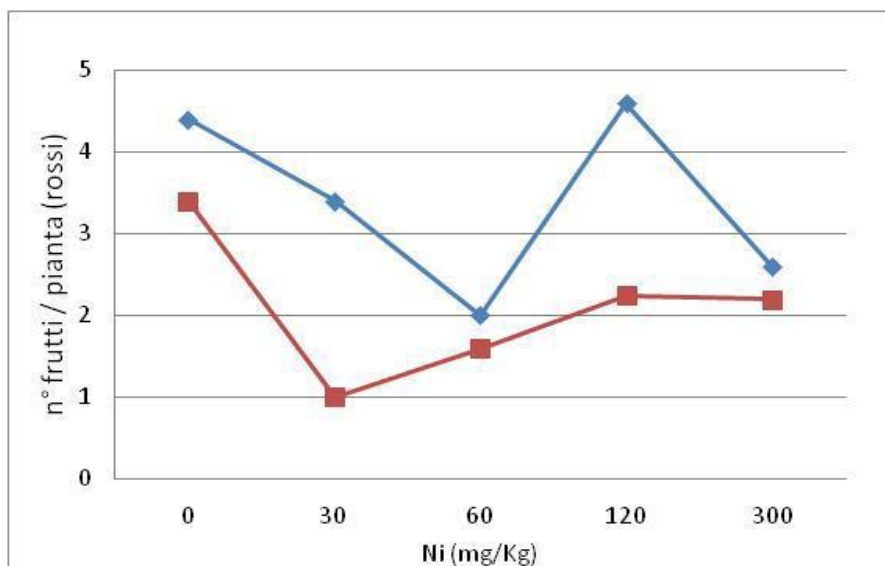


Figura 8 – Numero medio di pomodori per pianta nei diversi trattamenti. Cultivar: ‘Standard’ (blu), ‘Ingrid’ (rosso). N = 134

6.2.3 Produzione di biomassa dei frutti

Il raccolto complessivo, espresso come grammi di pomodoro fresco per pianta, viene mostrato in figura 9. A parte la cultivar ‘Standard’ alla concentrazione di 120 mg Kg⁻¹mg/kg, che mostra un picco produttivo, gli altri valori medi che riguardano pomodori trattati a diverse concentrazioni di Ni sono tutti inferiori ai pomodori di controllo. Tuttavia, differenze evidenziate non sono statisticamente significative in relazione all’elevata variabilità del raccolto da pianta a pianta.

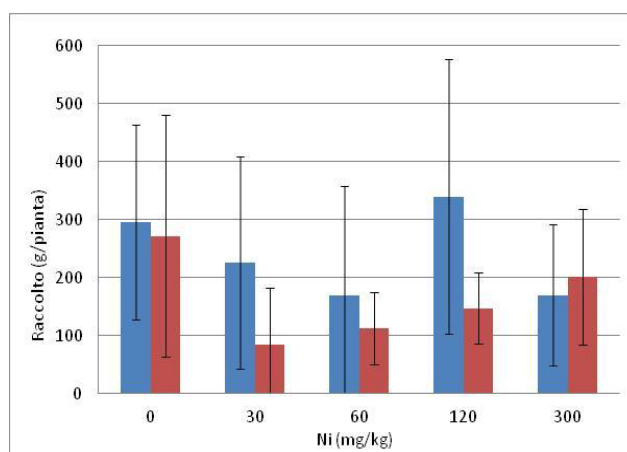


Figura 9 - Raccolto medio espresso in g/pianta rispetto ai diversi trattamenti di Ni. Cultivar: 'Standard' (blu), 'Ingrid' (rosso). N = 267. I dati sono medie \pm DS.

La sostanza secca % dei frutti maturi, definita come il rapporto percentuale tra peso secco e peso fresco, in risposta al Ni, è rappresentata in figura 10. La percentuale di sostanza secca dei frutti non cambia né in base alla cultivar considerata, né in base al Ni nel terreno, e varia tra il 7 e il 12 %.

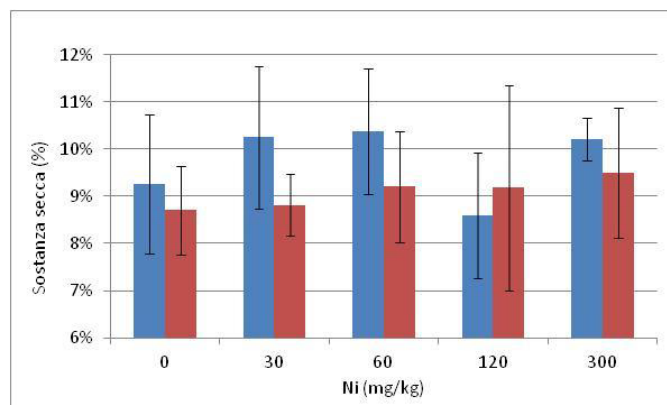


Figura 10 - Sostanza secca % dei frutti maturi rispetto alle diverse concentrazioni di Ni. Cultivar: 'Standard' (blu), 'Ingrid' (rosso). N = 93. I dati sono medie \pm DS.

6.2.4 Produzione di biomassa vegetale e accumulo di nichel in frutti di pomodoro

Data la distribuzione non normale dei dati si è proceduto con analisi statistiche non-parametriche per valutare eventuali correlazioni tra numero di frutti, peso dei frutti e accumulo di Ni nei diversi trattamenti e cultivar.

Considerando la produttività vegetale in termini di frutti prodotti (rosso, verde e totale), biomassa e accumulo di Ni di frutti, il rango delle correlazioni di Spearman (tabella 5) non evidenzia differenze significative tra le concentrazioni di Ni e la biomassa o numero di frutti. I trattamenti con Ni non sembrano correlati alla produttività del pomodoro, mentre le cultivar hanno correlazioni significative negative rispetto al numero totale di frutti prodotti (-0,364 $p < 0.05$; tabella 6), ma non rispetto alla biomassa dei frutti. I frutti verdi (G, acerbi) e rossi (R, maturi) non mostrano correlazioni significative rispetto agli altri parametri. Poiché la cultivar "Standard" è più produttiva rispetto a cultivar "Ingrid" in termini di frutti prodotti, i dati di produttività sono stati analizzati raggruppati per cultivar ottenendo gli stessi risultati precedentemente citati.

	Tot. nRF	Tot. nGF	Tot. nF	Tot. FW_RF	Tot. DW_RF	Tot. FW_GF	Tot. DW_GF	Mean weight	F Mean Ni RF	Mean Ni GF	Mean Ni F
Tot, nRF		ns	0,65	0,74	0,70	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Tot, nGF	ns		0,87	ns	ns	0,86	0,81	-0,37	ns	ns	ns
Tot, nF	0,65	0,85		0,38	0,32	0,73	0,68	-0,36	ns	ns	ns
Mean nF	0,65	0,85		0,38	0,32	0,73	0,68	-0,36	ns	ns	ns
Tot. FW_RF	0,74	ns	0,38		0,96	ns	ns	0,42	ns	ns	ns
Tot. DW_RF	0,70	ns	0,32	0,96		ns	ns	0,43	ns	ns	ns
Tot. FW_GF	ns	0,86	0,73	ns	ns		0,96	ns	ns	ns	ns
Tot. DW_GF	ns	0,81	0,68	ns	ns	0,96		ns	ns	ns	ns
Mean F weight	ns	-0,37	-0,36	0,42	0,43	ns	ns		ns	ns	ns
Mean RF	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		0,89	0,96
Mean GF	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,89		0,96
Mean F	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,96	0,96	

Tabella 5. Correlazioni per ranghi di Spearman. i dati in grassetto sono significativi a $p < 0,05$. Tot. nRF: numero totale di frutti rossi; Tot. nGF: numero totale di frutti verdi. Tot.nF: numero totale di frutti (rosso-verde); Media nF: numero medio di frutti prodotti; Tot. FW_RF: peso totale fresco dei frutti rossi; Tot. DW_RF: peso totale secco dei frutti rossi; Tot. FW_GF: peso totale fresco di frutti verdi; Tot. DW_GF: peso totale a secco di frutti verdi; Peso F medio: numero medio di peso dei frutti; Ni RF media: concentrazioni medie di Ni nei frutti rossi; Ni GF: concentrazioni medie.

	Tot. nRF	Tot. nGF	Tot. nF	Tot. FW_RF	Tot. DW_RF	Tot. FW_GF	Tot. DW_GF	Mean F weight	Mean Ni RF	Mean Ni GF	Mean Ni F
Ni treatme nt	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,84	0,80	0,82
Tomato cv	-0,43	ns	0,36	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Tabella 6 Correlazioni per ranghi di Spearman.: i dati in grassetto sono significativi a $p < 0,05$. Tot. nRF: numero totale di frutti rossi; Tot. nGF: numero totale di frutti verdi. Tot.nF: numero totale di frutti (rosso-verde); Tot. FW_RF: peso totale fresco dei frutti rossi; Tot. DW_RF: peso totale secco dei frutti rossi; Tot. FW_GF: peso totale fresco di frutti verdi; Tot. DW_GF: peso totale a secco di frutti verdi; Peso F medio: numero medio di peso dei frutti; Ni RF media:

concentrazioni medie di Ni nei frutti rossi; Ni GF: concentrazioni medie di Ni in frutti verdi; Ni F: concentrazioni medie di Ni nei frutti (rosso-verde).

L'analisi di correlazione per ranghi di Spearman non evidenzia valori significativi tra la concentrazione di Ni nei frutti e la biomassa o il numero di frutti.

In generale, nella correlazione per ranghi di Spearman il trattamento non sembra correlare con i dati di produttività del pomodoro, mentre la varietà ha una correlazione negativa rispetto al numero di frutti prodotti e non influenza la biomassa dei frutti stessi. Frutti verdi e rossi si comportano allo stesso modo.

Analizzando separatamente i dati della produttività per le 2 cultivar testate rispetto al trattamento si ottengono analoghi risultati.

Il test a due campioni di Kolmogorov-Smirnov tra i controlli e i trattamenti Ni per le concentrazioni Ni nella biomassa di frutti e frutti (tabella 7) ha mostrato che c'è una differenza significativa tra Ni in frutti rossa, verde e totale a partire da Ni60 per cultivar 'Standard' e Ni30 per cultivar 'Ingrid'. Tuttavia, non ci sono differenze significative per la biomassa e la produttività dei frutti tra i controlli e i trattamenti con Ni.

Parameters	'Standard'															'Ingrid'														
	C		Ni30			Ni60			Ni120			Ni300			C		Ni30			Ni60			Ni120			Ni300				
	μ	σ	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level		
Tot. nRF	4,4	3,0	3,4	1,7	p > .10	3,0	3,0	p > .10	4,0	3,0	p > .10	3,3	3,0	p > .10	2,8	1,6	1,0	1,0	p > .10	1,4	1,6	p > .10	1,8	1,6	p > .10	2,0	1,6	p > .10		
Tot. nGF	4,0	3,8	2,8	5,2	p > .10	7,0	3,8	p > .10	4,3	3,8	p > .10	2,3	3,8	p > .10	2,2	1,9	1,7	2,1	p > .10	2,6	1,9	p > .10	1,3	1,9	p > .10	4,0	1,9	p > .10		
Tot. nF	8,4	6,5	6,2	5,6	p > .10	10,0	6,5	p > .10	8,3	6,5	p > .10	5,5	6,5	p > .10	5,0	2,4	2,7	1,5	p > .10	4,0	2,4	p > .10	3,0	2,4	p > .10	6,0	2,4	p > .10		
Tot. FW_RF	206,6	113,0	115,7	65,4	p > .10	65,3	113,0	p > .10	113,6	113,0	p > .10	118,8	113,0	p > .10	175,4	143,5	75,5	90,7	p > .10	49,1	143,5	p > .10	72,3	143,5	p > .10	112,1	143,5	p > .10		
Tot. DW_RF	14,9	10,4	8,5	4,5	p > .10	5,0	10,4	p > .10	7,0	10,4	p > .10	9,2	10,4	p > .10	13,6	10,2	6,8	8,5	p > .10	3,8	10,2	p > .10	6,1	10,2	p > .10	9,9	10,2	p > .10		
Tot. FW_GF	88,9	77,0	110,4	182,8	p > .10	215,2	77,0	p > .10	128,2	77,0	p > .10	64,3	77,0	p > .10	72,9	66,5	32,5	28,6	p > .10	88,5	66,5	p > .10	75,0	66,5	p > .10	83,5	66,5	p > .10		
Tot. DW_GF	5,3	5,8	7,8	12,8	p > .10	12,7	5,8	p > .10	7,3	5,8	p > .10	3,9	5,8	p > .10	5,5	5,7	2,1	2,3	p > .10	5,8	5,7	p > .10	5,8	5,7	p > .10	6,3	5,7	p > .10		
Mean F weight	42,1	14,0	41,7	19,3	p > .10	28,4	14,0	p > .10	40,4	14,0	p > .10	31,3	14,0	p > .10	64,2	37,0	46,0	33,1	p > .10	36,6	37,0	p > .10	78,6	37,0	p > .10	33,8	37,0	p > .10		
Mean Ni RF	1,4	0,9	3,4	1,5	p < .10	6,5	1,6	p < .05	17,0	14,5	p < .025	26,8	4,4	p < .025	7,1	12,1	3,2	1,0	p > .10	4,9	2,1	p > .10	10,8	6,9	p > .10	25,5	7,7	p < .10		
Mean Ni GF	1,1	0,7	1,7	1,2	p > .10	8,0	2,6	p < .05	17,7	9,3	p < .025	31,4	17,0	p < .025	8,4	16,5	7,4	9,3	p > .10	5,4	2,8	p < .10	16,5	9,6	p > .10	25,7	6,9	p < .10		
Mean Ni F	1,2	0,5	2,6	0,9	p > .10	7,3	0,5	p < .05	17,4	11,7	p < .025	29,1	10,2	p < .025	7,7	14,3	5,3	5,0	p > .10	5,1	1,7	p < .10	13,7	8,1	p > .10	25,6	6,1	p < .10		

Tabella 7. Test di Kolmogorov-Smirnov a due campioni per il confronto dei controlli (C) con gli altri trattamenti Ni (Ni30, Ni60, Ni120, Ni300 mg/kg, rispettivamente) per quanto riguarda significatività e deviazione standard, considerando i parametri del pomodoro e le due cultivar utilizzate ('Standard' e 'Ingrid'). sono riportati i livelli di P. Le differenze significative sono contrassegnate in grassetto. Legenda dei parametri di pomodoro. Tot. nRF: numero totale di frutti rossi; Tot. nGF: numero totale di frutti verdi. Tot.nF: numero totale di frutti (rosso-verde); Tot. FW_RF: peso totale fresco dei frutti rossi; Tot. DW_RF: peso totale secco dei frutti rossi; Tot. FW_GF: peso totale fresco di frutti verdi; Tot. DW_GF: peso totale a secco di frutti verdi; Peso F medio: numero medio di peso dei frutti; Ni RF media: concentrazioni medie di Ni nei frutti rossi; Ni GF: concentrazioni medie di Ni in frutti verdi; Ni F: concentrazioni medie di Ni nei frutti (rosso-verde).

Parameters	'Standard'															'Ingrid'														
	C		Ni30			Ni60			Ni120			Ni300			C		Ni30			Ni60			Ni120			Ni300				
	μ	σ	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level	μ	σ	p-level		
Leaf DW	42,1	7,8	38,0	5,6	p > .10	37,2	4,1	p > .10	34,0	9,5	p > .10	40,5	6,8	p > .10	43,0	5,7	33,3	14,9	p > .10	38,0	3,8	p > .10	29,8	15,0	p > .10	30,2	2,2	p < .025		
Root DW	5,5	0,5	6,0	3,2	p > .10	6,7	1,9	p > .10	8,8	2,1	p < .10	5,6	3,9	p > .10	6,2	1,1	6,3	4,0	p > .10	9,8	4,4	p > .10	11,7	6,6	p < .10	7,1	2,1	p > .10		
Stem DW	41,3	4,9	44,6	6,4	p > .10	51,4	3,8	p < .025	46,7	10,9	p > .10	46,8	5,3	p > .10	41,4	6,3	34,2	12,2	p > .10	49,0	6,5	p > .10	43,2	16,7	p > .10	41,9	3,5	p > .10		
Tomato DW	20,2	15,8	16,3	10,8	p > .10	10,6	11,4	p > .10	20,2	15,8	p > .10	10,8	10,8	p > .10	19,0	13,9	5,3	8,9	p < .10	9,6	6,5	p > .10	9,5	6,5	p > .10	16,2	9,4	p > .10		
Leaf DM	31,9	8,8	35,2	12,6	p > .10	27,7	4,4	p > .10	21,3	3,6	p < .10	15,0	1,4	p < .025	46,9	11,3	50,8	28,8	p > .10	37,2	11,1	p > .10	35,1	22,9	p < .10	19,3	7,0	p < .025		
Stem DM	17,0	5,0	16,5	1,3	p > .10	19,2	1,2	p < .10	19,3	2,6	p > .10	15,0	1,6	p > .10	16,3	1,3	29,2	31,7	p > .10	20,4	2,1	p < .025	32,5	27,4	p < .025	19,3	2,7	p < .10		
Root DM	17,5	1,7	16,8	3,8	p > .10	17,0	3,4	p > .10	19,6	2,3	p > .10	14,9	7,7	p < .10	15,8	1,0	14,8	6,5	p > .10	20,4	6,6	p > .10	19,7	4,3	p > .10	16,9	4,0	p > .10		
Tomato DM	5,9	2,1	7,7	1,0	p > .10	5,0	3,5	p > .10	5,7	0,7	p > .10	3,1	3,1	p > .10	7,6	1,7	5,2	4,2	p > .10	7,6	1,5	p > .10	8,3	1,5	p > .10	8,5	0,6	p > .10		

Tabella 8. Test a due campioni di Kolmogorov-Smirnov per il confronto dei controlli (C) con gli altri trattamenti Ni (Ni30, Ni60; Ni120; Ni300 mg/kg, rispettivamente) per quanto riguarda la media e la deviazione standard, considerando i parametri della pianta e le due cultivar utilizzate ('Standard' e 'Ingrid'). sono riportati i livelli di P. Le differenze significative sono contrassegnate in grassetto. Legenda dei parametri: peso secco: DW; sostanza secca: DM.

Inoltre, il test a due campioni Kolmogorov-Smirnov per valutare differenze significative tra i controlli e i trattamenti Ni rispetto alla biomassa vegetale (radice, fusto, foglia, frutti DW e materia secca DM) (tabella 8) ha rivelato una differenza significativa per "Standard" di Ni60 (DW e DM) e da Ni 300 per foglia (DM). Per 'Ingrid' ha rivelato differenze significative da Ni60 e Ni 120 per fusto DM, e da Ni 300 per foglia (DW e DM). Riassumendo, la biomassa vegetale mostra differenze significative in risposta all'aumento dei livelli di Ni con una chiara evidenza a Ni 300.

Lo stesso test tra le due cultivar ha rivelato differenze significative tra la sostanza secca di frutti e foglie, più elevata in 'Standard', a sostegno dell'evidenza di una maggiore produttività dello 'Standard' rispetto a 'Ingrid' (tabella 9).

Parametri	'Standard'		'Ingrid'		p-level
	μ	σ	μ	Σ	
Frutti	15,55	12,78	11,93	10,00	p > .10
Foglie	38,33	7,00	34,85	10,44	p > .10
Fusti	46,17	7,03	41,94	10,51	p > .10
Radici	6,50	2,68	8,23	4,38	p < .10
Frutti SS	5,98	2,29	7,49	2,23	p < .01
Foglie SS	26,22	10,04	37,87	20,02	p < .05
Fusti SS	17,40	3,02	23,56	18,30	p > .10
Radici SS	17,162	4,22	17,50	5,02	p > .10

Tabella 9. Test a due campioni di Kolmogorov-Smirnov per il confronto tra cultivar 'Standard' e 'Ingrid' per quanto riguarda il significato e la deviazione standard. Sono riportati i livelli P. Le differenze significative sono contrassegnate in grassetto. I parametri vegetali sono espressi come peso secco. SS: sostanza secca

Applicando il test di Kolmogorov-Smirnov two-sample test tra controlli e trattati (raggruppati per varietà) si rileva che il trattamento nel suolo è significativo rispetto alla concentrazione di nichel ritrovata nei frutti a partire da Ni 60 per Standard e da Ni 30 per Ingrid.

L'analisi di correlazione per ranghi di Spearman sull'andamento della biomassa delle piante e dei frutti rispetto alla somministrazione di nichel nel terreno e alla diversa cultivar evidenzia forti correlazioni tra le biomasse dei pomodori e quella di fusti foglie e radici ma in modo non dipendente dai trattamenti. La medesima correlazione eseguita tra tutti i parametri biometrici e trattamenti + cultivar evidenzia che all'aumentare del trattamento aumento il peso fresco delle foglie e diminuisce quello secco (che significa più acqua incamerata nelle foglie all'aumentare del trattamento)

6.4 Accumulo di Nichel in frutti di pomodoro coltivato fuori suolo in azienda

I risultati delle determinazioni sui substrati di coltura e della soluzione di fertirrigazione in azienda agricola hanno evidenziato in tutti e 4 i cicli di coltivazione una presenza di Ni in tracce nelle soluzioni

di fertirrigazione, (0,01 mg/kg concentrazione media sia nella soluzione in entrata a monte della serra irrigata che nella soluzione in uscita a valle della stessa serra) ed in misura di 2,12 mg/kg come concentrazione media nel substrato di coltivazione, prima dell'avvio della coltura. Si tratta perciò di una concentrazione molto più bassa di quella presente nel substrato utilizzato per la coltivazione di controllo nella sperimentazione in mesocosmo.

I pomodori raccolti al termine dei 4 cicli di coltivazione, sono stati analizzati per la ricerca di Ni analogamente ai pomodori sottoposti al test in mesocosmo di cui ai paragrafi precedenti, utilizzando lo spettrofotometro XRF portatile a dispersione di energia (FP-EDXRF - Field Portable Energy Dispersive X-ray Fluorescence) di proprietà di Geospectra s.r.l.

Da tali analisi è emersa una concentrazione media di Ni di circa 0,56 mg/kg di peso secco (min 0 mg/kg e max 1,02 mg/kg, fig. 11) nei pomodori rossi raccolti nel ciclo di coltivazione dicembre 2017-giugno 2018 e di 0 mg/kg nei pomodori rossi raccolti nel ciclo di coltivazione agosto 2017 -novembre 2017. Tali dati di concentrazione media sono stati confermati nei due cicli colturali di agosto 2018 - novembre 2018 e di dicembre 2018 -giugno 2019 (Tab. 12). Si sottolinea che la perdita percentuale di peso dei pomodori analizzati è in media oltre il 97% del peso fresco (fig. 12). Tali risultati attestano che utilizzando substrati di coltivazione poveri di Ni, i pomodori prodotti da piante coltivate su tali substrati sono di conseguenza a bassissime o nulle concentrazioni di Ni.

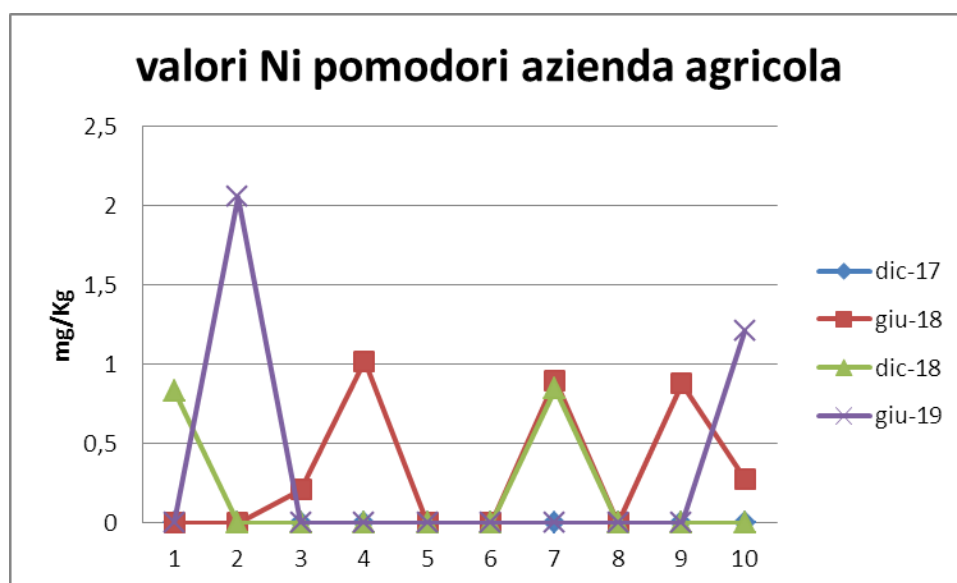


Figura 11 - Valori di Ni riscontrati nei singoli campioni di pomodoro (mg/kg peso secco) per ciclo di produzione. (dic. 17 valori sotto il limite di rilevabilità)

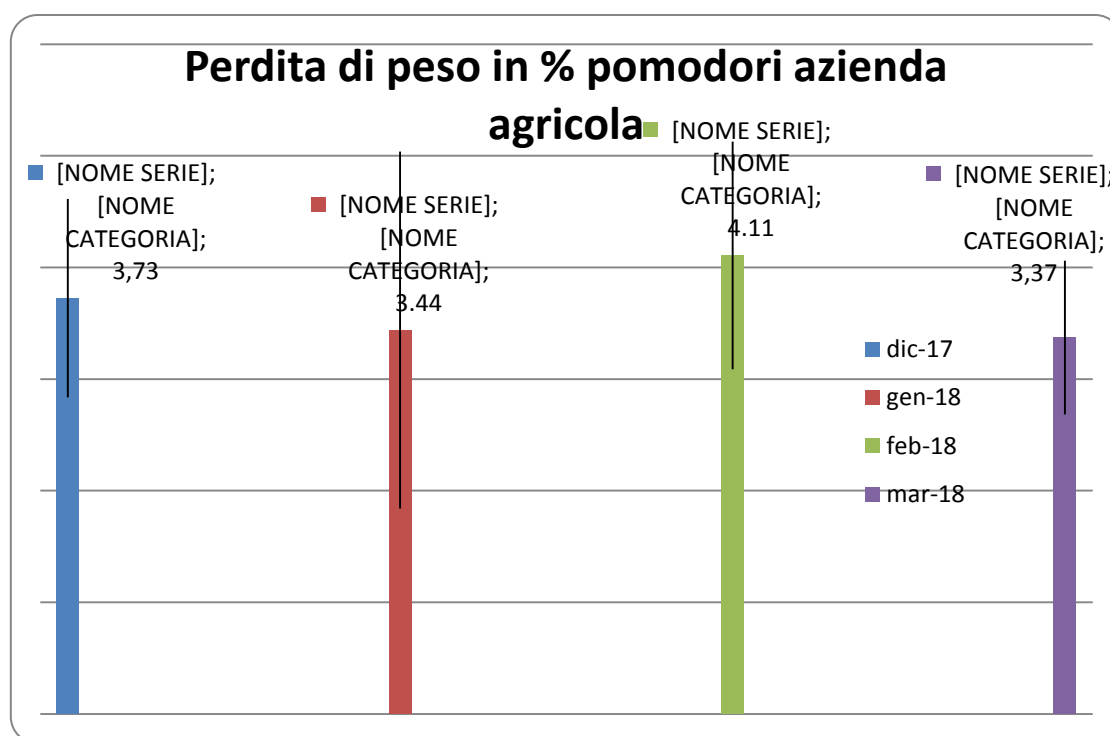


Figura 12 - Andamento peso secco/peso fresco dei pomodori raccolti nelle diverse campagne di coltivazione

data raccolta	peso fresco	DS	peso secco	Ds	% peso	DS
dic-17	115,35	33,23	4,21	1,35	3,73	0,89
giu-18	77,42	57,80	2,46	1,50	3,44	1,60
dic-18	200,62	76,46	8,18	4,37	4,11	1,02
giu-19	167,07	44,01	5,60	1,91	3,37	0,69

Tabella 12. Peso fresco e secco di pomodori raccolti in diversi cicli colturali. I dati riportati rappresentano valori medi con le relative deviazioni standard (DS).

Tali dati seppur relativi a concentrazioni estremamente basse, hanno evidenziato in maniera statisticamente significativa delle diversità di distribuzione delle concentrazioni di Ni fra i cicli di coltivazione (ANOVA 1,07239E-05), riscontrando i seppur minimi valori aumentati nelle campagne di dicembre 2017-giugno 2018 (media 0,56 mg/kg di peso secco con min 0 mg/kg e max 1,02 mg/kg, ds = 2,11) e agosto 2018 – novembre 2018 (2 soli valori di campioni con concentrazione di 0.81 mg/Kg di peso secco).

Tali risultati sono stati confrontati con le procedure di coltivazione al fine di valutarne le variazioni ed eventuali correlazioni. I risultati, che si riportano nelle fig. 13 e 14 mostrano un maggiore numero di

trattamenti di somministrazione e corrispondenti maggior quantitativi di sostanze (compresi antiparassitari) sui pomodori delle due campagne di coltivazione dicembre 2017-giugno 2018 e agosto 2018 – novembre 2018.

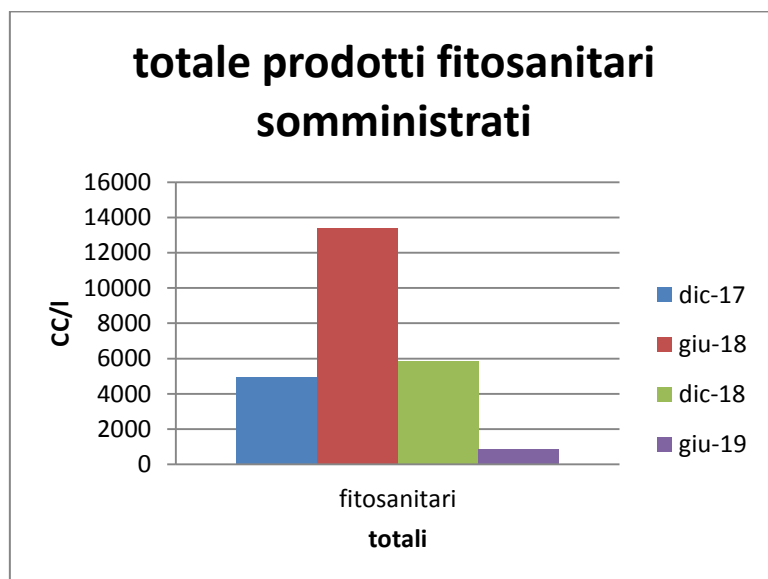


Figura 13 - Quantità di prodotti somministrati per campagna di coltivazione

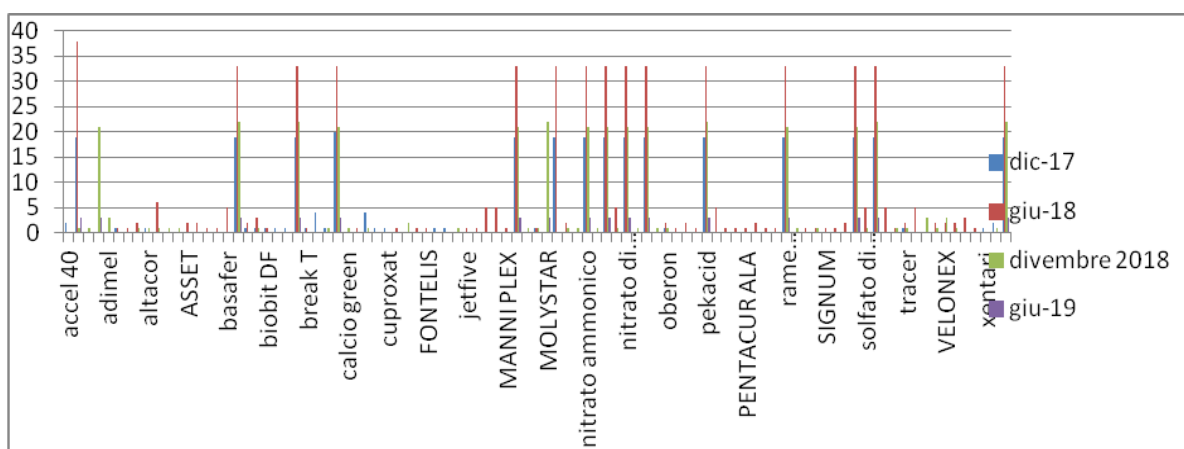


Figura 14 - N. trattamenti per sostanza nelle diverse campagne di coltivazione

Analizzando le possibili correlazioni trattamenti effettuati sulla pianta/prodotto utilizzato e concentrazioni di Ni nei pomodori utilizzando il test di Pearson sono state rinvenute delle correlazioni negative significative con l'utilizzo di XenTari® WG Insetticida biologico, a base di *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*, attivo contro le larve di lepidotteri ($r= 0.9551$ e $p=0.0449$) e Contro L ($r=0.9865$ $p= 0.0135$) entrambi insetticidi con trattamenti fogliari.

6.5 Contenuto di proteine allergeniche nei pomodori a diverso contenuto di Ni

6.5.1 Estratti proteici.

La Figura 15 mostra il dettaglio della concentrazione proteica ritrovata negli estratti totali dei pomodori analizzati, che va da 0,073 nei pomodori coltivati su terreno a basso contenuto di Ni a 0,511 mg/g dei frutti di piante trattate con somministrazione di Ni nel terreno di coltura. Il campione che mostra la concentrazione più elevata è in pomodori delle piante C-INGRID- verde, seguito da C-STANDARD-verde e Ni60-INGRID-Rosso (due pomodori di piante su terreno di crescita senza somministrazione di Ni e un pomodoro di piante su terreno di crescita a cui è stato somministrato Ni in concentrazione di 60 mg/kg).

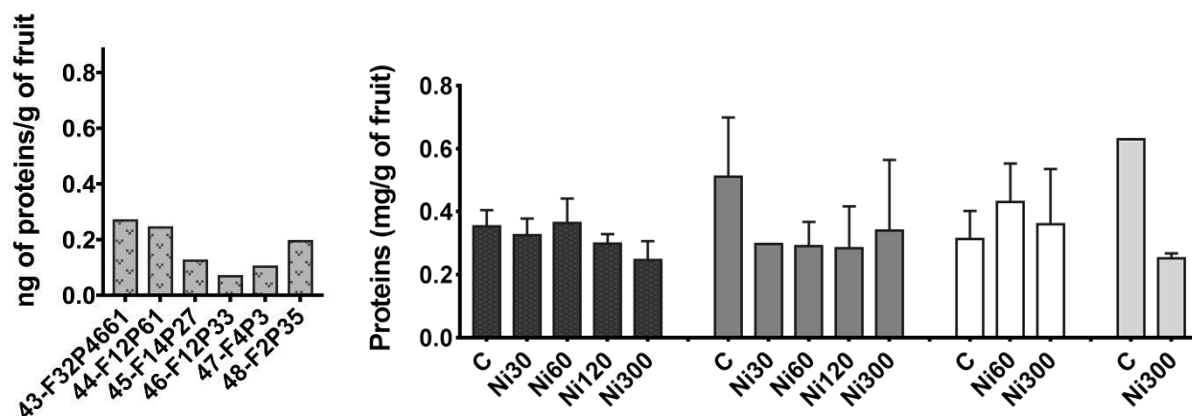


Figura 15 - concentrazione proteica in campioni di pomodoro coltivato fuori suolo (sx) e in condizioni sperimentali (dx) I dati sono misurati in doppio e riportati come medie. Le barre nere, grigio scuro, bianco e grigio chiaro indicano rispettivamente i campioni di pomodoro rosso Standard, verde Standard, rosso Ingrid e verde Ingrid. I valori delle misure effettuate come duplicati sono riportati come medie con intervallo.

Le quantità di proteine più basse si osservano nei campioni 45F14P27, 46F12P33, 47F4P3, 48F2P35 (Fig. 15, sx), che risultano essere tutti pomodori coltivati su terreno a bassa concentrazione di Ni della produzione in azienda agricola.

La figura 15 (dx) mostra la concentrazione media di proteine negli estratti totali dei pomodori trattati in serra con somministrazione di Ni nel suolo. Le barre rappresentano infatti la media dei valori ottenuti con campioni di pomodori rossi e verdi di ogni cultivar sottoposta allo stesso trattamento. Rispetto ai controlli, si osserva una leggera diminuzione della concentrazione proteica in tutti i campioni trattati con Ni della cultivar Standard. Tuttavia, non viene visualizzata una dipendenza da dose. La cultivar Ingrid mostra anche una leggera diminuzione delle proteine totali nei campioni trattati con Ni-300.

6.5.2 Analisi del contenuto di LTP (lipid transfer protein) e TLP (Thaumatin like proteins) nelle frazioni di proteine di pomodoro delle molecole di base

Gli estratti totali di pomodoro sono stati analizzati da RP-HPLC allo scopo di rilevare la quantità di LTP contenuta nei campioni. Tuttavia, l'analisi dei profili di eluizione ha indicato che il rilevamento delle LTP e la stima della loro quantità nei campioni non è stata facile. Ciò è dovuto in particolare alla bassa concentrazione di questo allergene rispetto agli altri componenti proteici. Per superare questo problema, considerando che l'LTP sono proteine di base, è stata ottenuta una frazione arricchita in componenti cationici da ogni estratto totale dalla separazione cromatografica con una resina dello scambiatore di anioni. Le frazioni sono state poi concentrate come riportato nella sezione Materiali e metodi e i loro profili proteici sono stati ottenuti da RP-HPLC. Ad esempio, la figura 16 mostra il profilo RP-HPLC della frazione contenente le proteine di base ottenute dall'estratto di Controllo-STANDARD-Rosso.

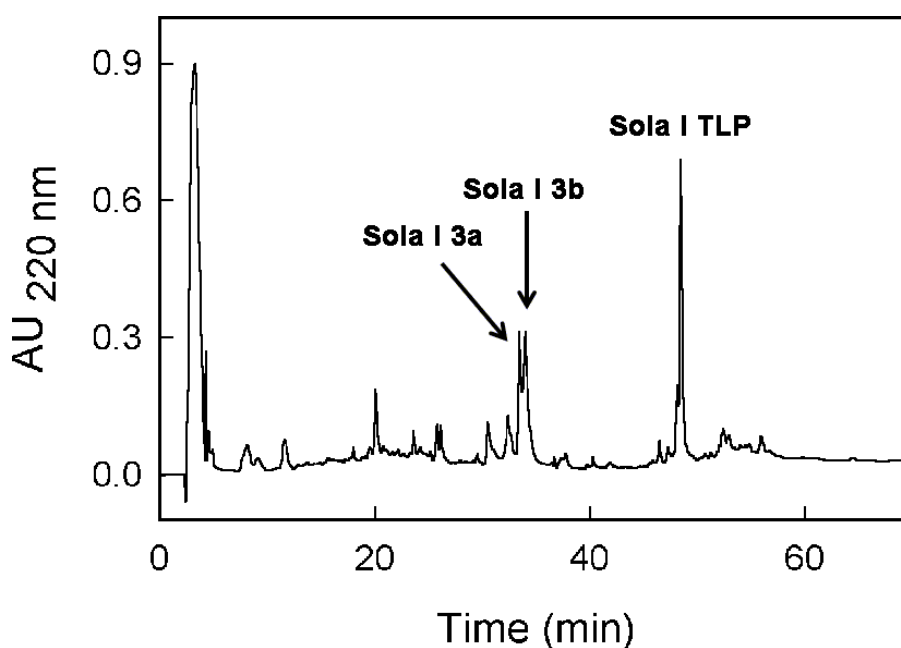


Figura 16 - Profilo RP-HPLC della frazione arricchita in proteine basiche ottenute dalla frazione contenente le proteine basiche ottenute dall'estratto di un controllo della cultivar Standard, pomodoro rosso. I picchi sono stati raccolti manualmente e Sola l 3a, Sola l 3b e TLP sono stati identificati mediante sequenziamento degli aminoacidi N-terminali.

I picchi eluiti sono stati raccolti e analizzati mediante sequenziamento diretto di amminoacidi. I picchi eluiti a 34,2 min e 34,8 min hanno entrambi fornito la stessa sequenza di terminali N, LSCGQVT. La ricerca di somiglianza con il database UniProtKB, con l'algoritmo BLASTP sul server ExPASy, ha permesso l'identificazione di entrambi come 9 kDa LTP, Sola l 3. Almeno due 9k-LTP trovati nel

database UniProtKB avevano la sequenza N-terminale ottenuta sperimentalmente (numeri di accessione A0A3Q7H96 e K4D1U9).

Essi sono stati etichettati come Sola l 3a e Sola l 3b (Figura 17).

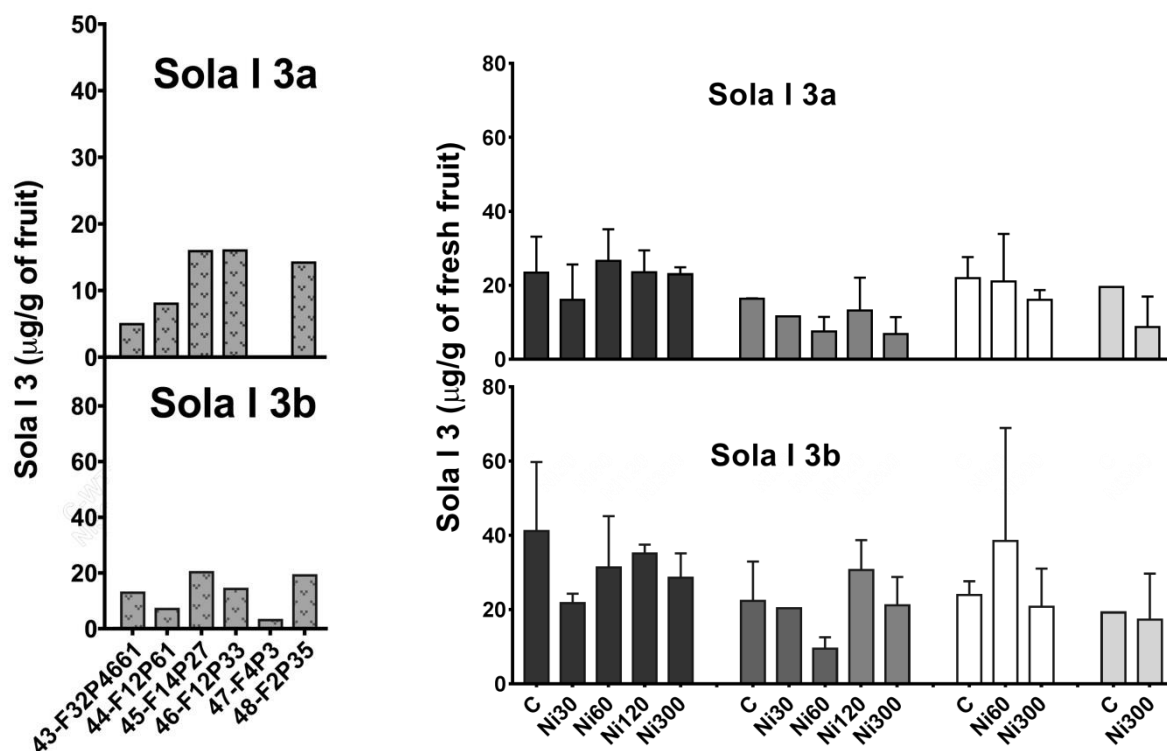


Figura 17 - Concentrazione di Sola l 3a (in alto) e Sola l 3b (in basso) in campioni di pomodoro coltivati fuori suolo (sx) e in condizioni sperimentali (dx). I dati sono prodotti in doppio e riportati come medie. Le barre nere, grigio scuro, bianco e grigio chiaro (dx) indicano rispettivamente i campioni di pomodoro rosso Standard, verde Standard, rosso Ingrid e verde Ingrid. I valori delle misure effettuate come duplicati sono riportati come medie con intervallo.

Pertanto, il rilevamento nel profilo di elusione RP-HPLC di più picchi LTP indica la presenza di isoforme nei campioni analizzati. La figura 17 mostra la quantità di Sola l 3 stimata nei campioni di pomodoro analizzati. Si può osservare una certa variabilità dei due isoforme Sola l 3.

Il campione di pomodoro 47-F4P3 (Fig. 17, sx) manca di quantità rilevabili della isoforme Sola l 3a. Questo esempio mostra anche una bassa quantità di Sola l 3b. Tuttavia, non è possibile osservare alcuna correlazione della concentrazione di LTP con i trattamenti Ni, salvo che una minor presenza di LTP Sola l 3 di entrambe le isoforme nei campioni provenienti dalla coltivazione in azienda agricola su suolo a bassa concentrazione di Ni.

Il componente eluito a 49,2 min è stato identificato come TLP (Sola l TLP) dal sequenziamento degli amminoacidi N-terminali che ha fornito la sequenza ATKEVRNNCP (Numero di accessione in UniProtKb P12670). La Figura 18 mostra la quantità di Sola l TLP stimata nei campioni di pomodoro analizzati e anche in questo caso è avvertibile chiaramente la minor presenza di Sola l TLP nei

campioni di pomodori provenienti da coltivazione in azienda agricola su suolo a bassa concentrazione di Ni (Fig. 18, sx).

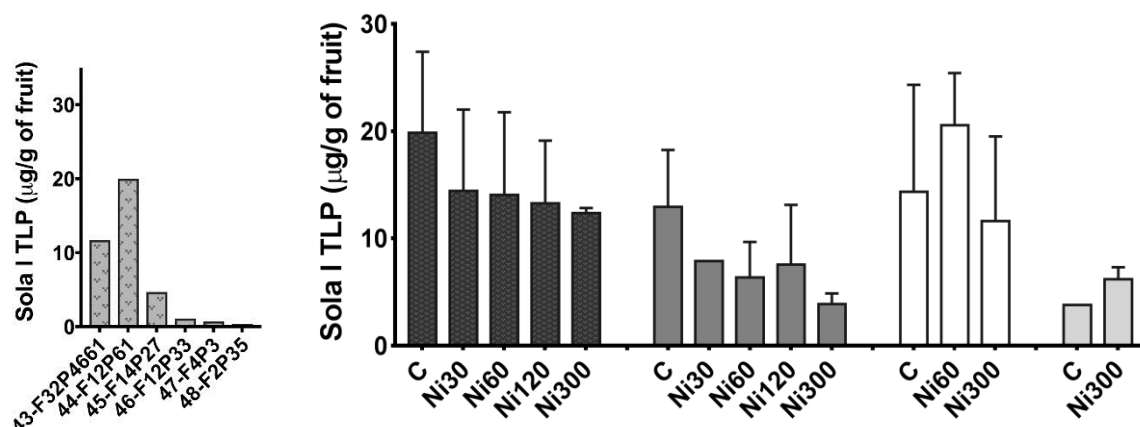


Figura 18 - Concentrazione di TLP in campioni di pomodoro ottenuti da coltura fuori suolo (sx) e da condizioni sperimentali (dx). I dati sono prodotti in doppio e riportati come valore medio. Le barre nere, grigio scuro, bianco e grigio chiaro indicano rispettivamente i campioni di pomodoro rosso Standard, verde Standard, rosso Ingrid e verde Ingrid. I valori delle misure effettuate come duplicati sono riportati come medie con intervallo.

Le analisi di regressione lineare tra contenuto di Ni nei frutti di pomodoro e la presenza di LTP e proteine allergeniche rileva correlazione (intervallo di confidenza al 95% e $p < 0.05$) tra Ni nel pomodoro e proteine totali mg/ml estratto e microgrammi di taumatina /g frutto (Tab. 13). Anche La correlazione di Pearson tra biomassa da frutti e proteine espressa e le concentrazioni finali di Ni nel suolo e nei pomodori (tabella 13) ha evidenziato una correlazione molto significativa tra Ni nel pomodoro e taumatina ($r=0,3993$, $p < 0,01$) e Ni nel suolo e taumatina ($r=0,5082$, $p < 0.01$).

Parameters	Ni soil (mg/kg)	Ni tomato (mg/kg)
Peso fresco frutti (mg)	-0,08	-0,28
Estratti (mg ml ⁻¹)	-0,38**	-0,50**
Tot. Proteine (mg)	-0,11	-0,29*
mg proteine g frutto ⁻¹	-0,33*	-0,34*
LTP1+LTP2 (µg g ⁻¹ di frutto)	-0,24	-0,20
LTP1 (µg g ⁻¹ di frutto)	-0,32*	-0,27
LTP2 (µg g ⁻¹ di frutto)	-0,21	-0,17
µg taumatina g ⁻¹ di frutto	-0,50**	-0,40**

Tabella 13. Correlazioni di Pearson (suolo Ni e pomodoro) rispetto alla biomassa dei frutti e alle proteine espresse. Significativo * $p < 0,05$ **altamente significativo $p < 0.01$.

6.6 Risposte anticorpali di sieri di pazienti allergici al pomodoro alla somministrazione di pomodori a basso contenuto di Ni

6.6.1 Analisi del contenuto di allergeni nei campioni di pomodoro da test di inibizione delle IgE

Gli allergeni contenuti nei campioni di pomodoro trattati con Ni300 sono stati studiati attraverso test immunologici e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con campioni di controllo di pomodoro non trattato dell’esperimento in serra. Due campioni di pomodoro rosso trattati con Ni300 sono stati analizzati con il saggio SPHIAa e riportati come valori medi (Figura 19, in alto).

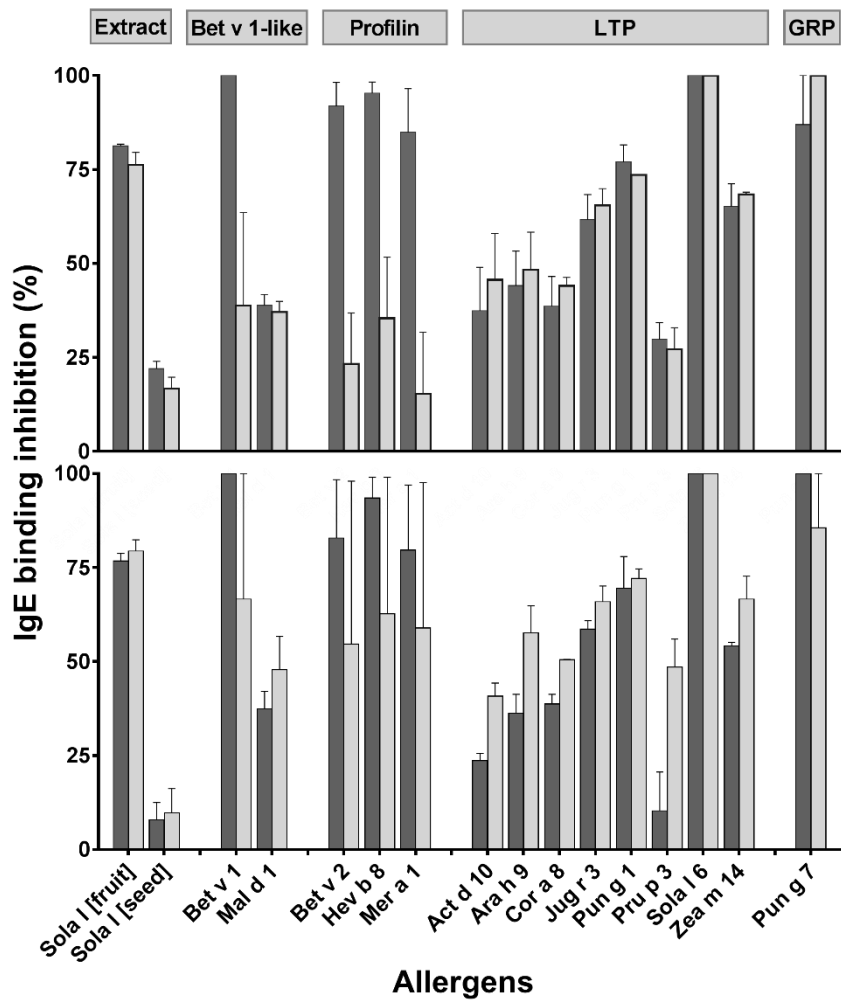


Figura 19 - Saggi di inibizione delle IgE effettuati con gli estratti di pomodoro della cultivar standard usando il sistema di test FABER con il metodo SPHIAa. Pomodori rossi maturi (pannello superiore) e verdi non maturi (pannello inferiore) sono stati analizzati con un mix di sieri di pazienti sensibilizzati agli alimenti vegetali e utilizzati come fornitori di IgE specifiche. I pomodori non trattati sono indicati con colonne nere, mentre i campioni trattati con Ni300 sono indicati con colonne grigie. I dettagli degli allergeni analizzati sono riportati nella Tabella 1. I valori provengono da duplicati riportati come medie con intervallo.

Questi risultati sono stati confrontati con i valori medi ottenuti da due campioni di controllo. Inoltre, due campioni di pomodoro verde trattati con Ni300 sono stati analizzati e confrontati con quelli di due campioni di controllo.

Gli allergeni immobilizzati sul biochip FABER e analizzati con gli estratti di pomodoro usando il test SPHIAa, sono riportati in tabella 14.

Protein family	Allergen	Source
n.a.	Sola l [fruit]	tomato (whole fruit)
	Sola l [seed]	tomato seed
Bet v 1-like	Bet v 1	birch pollen
	Mal d 1	apple fruit
Profilin	Bet v 2	birch pollen
	Hev b 8	latex
	Mer a 1	annual mercury pollen
LTP	Act d 10	kiwifruit seed
	Ara h 9	peanut seed
	Cor a 8	hazelnut seed
	Jug r 3	walnut seed
	Pun g 1	pomegranate pulp
	Pru p 3	peach fruit
	Sola l 6	tomato seed
	Zea m 14	corn seed
GRP	Pun g 7	pomegranate pulp

Tabella 14. Dettagli sugli allergeni immobilizzati sul biochip FABER e analizzati con gli estratti di pomodoro usando il test SPHIAa

I risultati ottenuti mostrano che l'inibizione sull'intero estratto dei frutti è superiore a quella osservata sull'estratto di semi di pomodoro. Le molecole completamente inibite (100% di inibizione) dal pomodoro rosso e verde trattate con Ni300 sono state Bet v 1. Sola l 6, rappresenta l'unico allergene purificato dal pomodoro disponibile sul biochip FABER. Sia il pomodoro rosso che quello verde trattato Ni300 mostrano una minore capacità di inibizione su Bet v 1 e sulle tre profiline rispetto al pomodoro non trattato. Questo risultato suggerisce che i campioni di pomodoro trattati Ni300 contengono quantità inferiori di allergene che risponde a Bet v 1 e alle profiline. La quantità di questi allergeni appare particolarmente diminuita nel pomodoro rosso trattato con Ni300.

7. DISCUSSIONE

I risultati del lavoro svolto hanno permesso pertanto di confermare che la pianta del pomodoro risente in tutte le sue fasi di sviluppo della presenza del nichel biodisponibile nel suolo ed è possibile individuare delle modalità produttive del pomodoro che riducono sensibilmente la presenza di nichel nel frutto, attraverso facili pratiche agronomiche. Per quanto riguarda il potenziale allergenico legato al contenuto di proteine allergizzanti nei frutti i risultati del lavoro svolto mostrano invece la necessità di proseguire ulteriori indagini per migliorare la conoscenza del processo che sembra avere delle correlazioni con la presenza del Nichel somministrato ma i cui contorni risultano ancora sfumati. Analizzando i risultati dei test di germinazione e di allungamento radicale condotti appare una significativa diminuzione Ni-dipendente. Il Ni è un metallo pesante noto in letteratura per gli effetti negativi che può indurre sull'allungamento radicale di diverse varietà orticole tra cui il pomodoro (Seregin e Kozhevnikova, 2006). Di Salvatore *et al.* (2008) mostrano una riduzione dell'allungamento radicale delle plantule di pomodoro 'Principe borghese' a partire dalla concentrazione di 47 mg/kg su carta bibula. Negli esperimenti condotti entrambe le cultivar di pomodoro hanno mostrato una netta e significativa diminuzione dell'allungamento radicale alla concentrazione di Ni 300 mg/kg sebbene la tendenza al calo si possa vedere già dalla concentrazione di Ni 30 mg/kg. Inoltre, la cultivar 'Standard', con un EC_{50} pari a 30 mg/kg di Ni risulta essere più sensibile della cultivar 'Rugantino', che invece ha un EC_{50} superiore, con minor effetto fitotossico sull'indice di germinazione.

Il pomodoro è una pianta sensibile anche ad altri metalli. Di Salvatore *et al.* (2008) osservano una riduzione significativa della lunghezza radicale della cultivar 'Principe borghese' alle concentrazioni di 47 mg/kg sia di Pb che di Cu, e alla concentrazione di 23 mg/kg di Cd. Inoltre, per quanto riguarda l'inibizione della germinazione della cultivar 'Pusa ruby', Singh *et al.* (2011) e Shekar *et al.* (2017) osservano gli effetti del Cd a partire dalla concentrazione di 100 mg/kg sia su substrato di carta bibula sia su suolo. Questo indica che nelle fasi precoci di sviluppo il pomodoro manifesta un certo livello di sensibilità a diversi metalli più o meno in concentrazioni essenziali tra cui il Ni.

Elevate concentrazioni di Ni nei vegetali possono interferire in differenti processi fisiologici e biochimici che si traducono in manifestazioni macroscopiche visibili nelle piante adulte (Chen *et al.*, 2009; Gajewska e Sklodowska, 2007; Kopittke *et al.*, 2007). Nel nostro esperimento non si sono osservati evidenti sintomi di fitotossicità come clorosi, necrosi e appassimento fogliare.

Considerando le perdite relative registrate nei suoli sottoposti a sperimentazione risulta evidente che al termine del ciclo produttivo delle piante di pomodoro un'aliquota significativa del Ni aggiunto come Nichel solfato esaidrato è stata persa dal suolo. La perdita relativa aumenta in modo lineare passando dalle aggiunte più basse (Ni30) verso quelle più alte (Ni300). In qualunque caso è evidente tuttavia che la concentrazione finale di Ni nel suolo è sempre più elevata del valore di background del substrato iniziale. Questa è un'ulteriore testimonianza del fatto che il Ni contenuto nella frazione sabbiosa (scheletro) risulta immobile alle condizioni e nelle tempistiche dell'esperimento, mentre per quanto

riguarda la frazione di nichel somministrato, la perdita può essere attribuita in parte a processi di leaching da parte delle soluzioni di irrigazione ed in parte da processi di uptake da parte delle piante in crescita. Basandosi sui risultati delle analisi sulla componente vegetale e sulla mancanza di significative proporzioni di precipitati nel sottovaso si ritiene che la gran parte della perdita di nichel da parte del suolo sia pertanto da attribuire all'effettiva rimozione da parte della pianta.

Per quanto riguarda i possibili effetti sugli organi vegetali, entrambe le cultivar tendono ad aumentare la biomassa fogliare fresca all'aumentare del Ni. In particolare, la cultivar 'Standard' ha un aumento della biomassa alla massima concentrazione di Ni (300 mg/kg), mentre 'Ingrid' lo ha già alla concentrazione di Ni 120 mg/kg. Poulik (1999) tratta una diversa cultivar di pomodoro ('Tornado') e, considerando le porzioni epigee (foglie e fusto) nel loro insieme, osserva un aumento della loro biomassa fresca a partire dalla concentrazione di 84 mg/kg di Ni. Se, come nel caso di Poulik (1999), si valutano le porzioni epigee delle cultivar trattate nel nostro esperimento, soltanto 'Standard' ha effettivamente un aumento complessivo di biomassa all'aumentare della concentrazione di Ni, mentre 'Ingrid' mantiene una biomassa epigea pressoché costante rispetto al controllo. Questa diversità nella risposta delle cultivar ai diversi trattamenti è data dalla biomassa dei fusti, che per la cultivar 'Standard' aumenta. Inoltre, sebbene ci sia un effetto sulle biomasse fresche dovuto al trattamento con Ni, per entrambe le cultivar (differenza di peso tra controlli e Ni300), c'è anche un effetto dovuto alla variabile cultivar, ovvero c'è una differenza di comportamento delle due cultivar alla massima concentrazione, con la 'Ingrid' che presenta valori inferiori rispetto alla 'Standard' per quanto riguarda le biomasse fogliari e le porzioni epigee nel loro insieme.

Normalmente il Ni induce inibizione della crescita vegetale (Chen *et al.*, 2009), mentre nel nostro esperimento questa inibizione non risulta altrettanto evidente come si può vedere dalle fluttuazioni della biomassa epigea; questo potrebbe apparentemente indicare una resistenza al Ni. Tuttavia, prendendo in considerazione la biomassa fogliare secca si nota che la cultivar 'Ingrid' contiene un maggiore tenore d'acqua rispetto alla 'Standard' e mostra perciò un calo a Ni 300 mg/kg. Considerando però la biomassa epigea secca nel suo complesso non si hanno variazioni tra controlli e trattati per entrambe le cultivar. Poulik (1999) osserva un aumento della biomassa epigea a partire da basse concentrazioni di Ni (17 mg/kg) mentre Palacios *et al.* (1998) e Kumar *et al.* (2015) osservano una diminuzione di biomassa epigea a partire da concentrazioni di Ni ancora inferiori: 15 e 3 mg/kg di Ni, rispettivamente.

Questi tre studi dimostrano come ci possa essere un comportamento diverso quando si considerano cultivar di pomodoro differenti, che nel caso di Poulik (1999), Palacios *et al.* (1998) e Kumar *et al.* (2015) sono rispettivamente 'Tornado', 'Marmande' e 'Ikram'.

Nel presente studio è stata valutata anche la sostanza secca % delle porzioni epigee; questo indice, rispetto ai parametri precedentemente presi in considerazione, sembra esprimere meglio la perdita d'acqua complessiva che avviene negli organi epigei in risposta al Ni. In letteratura questo indice è preso in considerazione esclusivamente per la fruttificazione (Kumar *et al.*, 2015; Migliori *et al.*, 2017;

Papadaki *et al.*, 2017) ma si ritiene che sia un parametro utile anche per valutare la produzione complessiva di biomassa di pomodoro in risposta ad uno stress abiotico. Nel nostro esperimento si osserva come la sostanza secca % delle foglie diminuisca a Ni 300 mg/kg nella cultivar 'Standard' e a Ni 120 mg/kg nella 'Ingrid'. Valutando invece la sostanza secca % delle porzioni epigee si ha un calo solo nella cultivar 'Standard' alla massima concentrazione in relazione alla diversa variazione di biomassa dei fusti precedentemente discussa.

Per quanto concerne l'apparato radicale, sia la biomassa fresca che quella secca aumentano all'aumentare della concentrazione di Ni fino alla concentrazione di 120 mg/kg per poi calare a valori confrontabili con il controllo a Ni 300 mg/kg, concentrazione che sembra comunque avere effetto su entrambe le cultivar. Questo è in disaccordo con gli studi di Kumar *et al.* (2015) e di Palacios *et al.* (1999) che osservano una diminuzione della biomassa secca a partire dalle concentrazioni di Ni rispettivamente di 3 e 15 mg/kg a sottolineare l'effetto fitotossico del Ni sulle cultivar da loro prese in considerazione. Considerando la sostanza secca % radicale della nostra sperimentazione, non si notano variazioni significative tra controlli e trattati. Questo potrebbe sostenere l'assenza di un manifesto effetto fitotossico del Ni rispetto alla produzione di biomassa vegetativa in piante adulte delle cultivar prese in considerazione.

Valutando il peso medio dei frutti maturi (rossi) prodotti alle diverse concentrazioni di Ni si nota un comportamento diverso tra le cultivar. Infatti, la 'Standard' mostra una tendenza negativa all'aumentare della concentrazione di Ni, in particolare per le piante trattate a Ni 300, mentre la 'Ingrid' non mostra variazioni tra controlli e trattati. Poulik (1999) osserva un incremento del peso fresco dei frutti rispetto ai controlli specialmente a basse dosi, 14 e 28 mg/kg, mentre Kumar *et al.* (2015) osservano un decremento del peso fresco già alla concentrazione di 3 mg/kg di Ni. Riguardo al peso secco, invece, Poulik (1999) osserva un decremento dalla dose di 28 mg/kg e Palacios *et al.* (1998) osservano un decremento del peso secco alla concentrazione di 5 mg/kg di Ni.

Decrementi significativi del peso dei frutti a concentrazioni di Ni così basse rispetto a quelle utilizzate nel nostro esperimento potrebbero rispecchiare delle condizioni culturali diverse che rendono il Ni più o meno biodisponibile a seconda dei casi. Nella letteratura presa in considerazione (Palacios *et al.*, 1998; Poulik, 1999; Kumar *et al.*, 2015), viene utilizzato un substrato inerte: sabbia di fiume negli esperimenti di Poulik (1999) e quarzifera in quelli di Kumar *et al.* (2015), mentre Palacios *et al.* (1998) coltivano il pomodoro in sistema idroponico. Questo potrebbe variare la biodisponibilità del metallo, quasi totalmente disponibile nei casi studio citati in precedenza, e più probabilmente in parte adsorbito dalla frazione organica nel nostro esperimento dove si è utilizzato un terriccio costituito da due parti di sabbia e una parte di torba. In aggiunta, il diverso comportamento delle piante per quanto riguarda i pesi dei frutti, potrebbe essere dovuto alla natura stessa delle cultivar, in quanto Cuor di Bue 'Standard' è una cultivar tradizionale, mentre 'Ingrid' è innestata su portainnesto 'Beaufort' resistente ai fitopatogeni. Come dimostrato da Kumar *et al.* (2015) ci può essere una differenza sostanziale nel

peso fresco della cultivar 'Ikram' quando è innestata su diversi portainnesti ('Black Beauty', 'Unifort' e 'Maxifort').

Valutando il numero medio complessivo di frutti prodotti per pianta e il raccolto (g/pianta) non abbiamo rilevato differenze tra controlli e trattati in entrambe le cultivar. Anche Poulik (1999) non osserva differenze significative nel numero di frutti per pianta, mentre Kumar *et al.* (2015) registrano una diminuzione sia del raccolto sia del numero di frutti per pianta a partire dalla concentrazione di 3 mg/kg.

La sostanza secca (%) dei frutti maturi, che rappresenta la percentuale di solidi totali naturalmente presenti nel pomodoro (sostanze solubili + sostanze insolubili) ed è considerato un indice qualitativo del frutto (Kumar *et al.*, 2015), non ha subito cambiamenti rispetto alle singole concentrazioni di Ni testate in entrambe le cultivar. Nonostante il Ni possa influenzare il peso medio dei frutti maturi della cultivar 'Standard', sia il raccolto che la qualità del frutto non hanno subito variazioni.

Dai dati sulla concentrazione di Ni presente nei frutti di pomodoro, si è osservato un trasferimento del metallo alle bacche pari al 10% della concentrazione presente nel substrato e/o medium di coltura, dato in accordo con quanto osservato da Poulik (1999) sebbene a concentrazioni di Ni significativamente inferiori a quelle prese in esame nella presente sperimentazione. Poiché il Ni normalmente presente in un frutto di pomodoro si attesta ad una concentrazione variabile tra 0,1 e 1 mg/kg (Rodriguez-Iruretagoiena *et al.*, 2015), una concentrazione 30 volte superiore al controllo comporta un elevato rischio potenziale per la salute umana. Come si può rilevare dai dati dell'esperimento in mesocosmo, in entrambe le cultivar (Standard e Ingrid) nei frutti che hanno raggiunto completo stadio di maturazione (rossi) l'andamento dei tenori di Ni riscontrato è fortemente correlato ai livelli di Ni somministrato nel terreno, in maniera statisticamente significativa per entrambe le cultivar confermando la tendenza di accumulo di tale specie.

Comparando le concentrazioni di Ni riscontrato nei pomodori rossi fra le due cultivar a parità di trattamento non si osservano andamenti differenti anche a livello statistico, riscontrando pertanto una analogia di comportamento per il Ni fra la cultivar Standard e Ingrid.

Tali risultati sono confermati anche dai bassissimi a valori di Ni riscontrati nei frutti di pomodoro coltivati in azienda agricola su suolo a quasi nullo contenuto di tale metallo, attestando dunque che utilizzando suoli di coltivazione poveri di Ni, i pomodori fruttificati da piante coltivate su tali suoli sono di conseguenza a bassissime o nulle concentrazioni di Ni.

In riscontro a tale considerazione vi è l'evidenza che i pomodori relativi a cicli di coltivazioni in azienda, seppur riportanti concentrazioni estremamente basse, hanno evidenziato in maniera statisticamente significativa delle diversità di distribuzione delle concentrazioni di Ni fra i cicli di coltivazione che è stato possibile correlare con i diversi trattamenti fitosanitari effettuati, ed in particolare un maggiore numero di trattamenti di somministrazione, corrispondenti maggior quantitativi di sostanze (compresi antiparassitari) sui pomodori, è stato associato ai seppur minimi quantitativi di Ni riscontrato nei frutti a maturazione.

L'analisi della concentrazione totale di proteine nei diversi campioni di pomodoro ha rivelato alcune alte variazioni, anche tra i frutti che avevano ricevuto lo stesso trattamento. Tuttavia, analizzando statisticamente i dati le singole differenze osservate tra i frutti analizzati sono fortemente ridotti. Infatti, la maggior parte dei campioni ha mostrato valori medi di circa 0,3 mg di proteine per g di frutti. Non è stata osservata invece alcuna correlazione tra la concentrazione di proteine e i trattamenti di Ni. Analogamente, l'analisi sull'allergene 9k-LTP Sola l 3 (Pravettoni *et al.*, 2009) e TLP (Westphal *et al.*, 2003) non consente l'identificazione di una chiara correlazione tra i trattamenti Ni e il contenuto di questi allergeni nei campioni di pomodoro analizzati da RP-HPLC. Le due isoforme LTP identificate in questi frutti di pomodoro mostrano una chiara variazione della loro concentrazione nei diversi campioni. L'analisi delle isoforme dell'allergene Sola l 3 sia come componenti separati sia come somma delle due isoforme rilevate, non mostrano correlazione con i trattamenti Ni. Anche l'analisi del contenuto di allergeni nei campioni di pomodoro sottoposti ai test immunologici FABER hanno confermato che la somministrazione del Ni non influisce sulle quantità di 9k-LTP nei campioni di pomodoro analizzati.

Questi risultati evidenziano solo il diverso pannello di epitopi IgE che l'LTP analizzato condivide con il pool di omologhi di pomodoro. Pertanto, non è sorprendente che l'allergene del pomodoro 7k-LTP, Sola l 6, sia completamente inibito, sottolineando così che gli estratti utilizzati per questi esperimenti contengono il pannello previsto di epitopi di pomodoro LTP IgE. È interessante notare che si osserva anche una bassa condivisione dell'epitopo con l'LTP considerato il più potente sensibilizzante, Pru p 3. Al contrario, alti valori di inibizione sono stati osservati su altre LTP, come Pun g 1 da melograno, Jug r 3 da noce e Zea m 14 dal mais, suggerendo anche un alto livello di condivisione dell'epitopo IgE.

I dati ottenuti suggeriscono che, nel trattamento di Ni, una quantità complessiva più alta di Sola l 3, e anche di TLP, può essere trovata nella cultivar di pomodoro rosso, rispetto agli altri frutti. I test immunologici per valutare la rispondenza allergenica dei campioni di pomodoro oggetto della ricerca sul biochip FABER, hanno confermato che l'applicazione Ni non influisce sulla quantità di LTP nei campioni di pomodoro analizzati. Allo stesso modo, la concentrazione di GRP sembra inalterata, mentre non è chiaro il comportamento di Bet v 1-come allergeni. L'analisi dell'inibizione del legame IgE sugli allergeni profilina osservate sul biochip FABER ha rivelato una significativa diminuzione di questo allergene nei campioni di pomodoro che hanno ricevuto Ni300. Questo effetto è stato più evidente nei pomodori maturi, confermando così il rapporto di letteratura che descrive la diminuzione della profilina nel pomodoro trattato con 500 ppm di Ni (Georgiadou *et al.*, 2018).

Una leggera diminuzione della concentrazione di allergeni TLP (Westphal *et al.*, 2003) nel pomodoro trattato con Ni è stata osservata nei campioni maturi e acerbi della sola cultivar Standard. Tuttavia, questa variazione non mostra un comportamento dose-dipendente. La variazione di TLP sembra essere influenzata dalla cultivar specifica poiché i risultati ottenuti con la cultivar Ingrid sono diversi rispetto a quello Standard. I test di inibizione del legame IgE hanno permesso l'estensione della valutazione ad altri allergeni del pomodoro, vale a dire Sola l 4 (un allergene simile a Bet v 1) e Sola l 1 (una profilina). I risultati ottenuti suggeriscono che la presenza di Ni potrebbe ridurre la

concentrazione dell'allergene del pomodoro Sola l 4, poiché l'estratto dei campioni trattati da Ni300 è meno efficiente per inibire l'omologa di betulla Bet v 1. Tuttavia, i dati ottenuti sull'omologo mela, Mal d 1, non confermano questo effetto. Pertanto, sono necessari ulteriori studi con un numero maggiore di campioni. È stato invece osservato un significativo effetto del Ni sulla concentrazione di profilina di pomodoro (Sola l 1). Infatti, l'analisi dell'inibizione del legame IgE sulle profiline al test biochip FABER ha rivelato una significativa diminuzione di questo allergene nei campioni di pomodoro trattati con Ni300.

I test di inibizione delle IgE eseguiti in questo studio hanno permesso anche l'identificazione di una proteina appartenente alla famiglia GRP come nuovo potenziale allergene. Tale proteina infatti è risultata competitiva con l'allergene GRP di melograno, Pun g 7, per il legame a IgE specifico. Le GRP sono proteine onnipresenti nelle piante e la loro espressione è regolata dall'ormone vegetale gibberellina. Attualmente, diversi componenti di questa famiglia sono stati descritti come allergeni, come Pru p 7 da pesca (Tuppo *et al.*, 2013), Pun g 7 dal melograno (Tuppo *et al.*, 2017), Cit s 7 da arancia (Inomata *et al.*, 2018), Pru m 7 da albicocca giapponese (Inomata *et al.*, 2017) e Coppa s 7 da cypr polline (Tuppo *et al.*, 2013). Questa proteina era già descritta in pomodoro (Shi *et al.*, 1998), ma non era mai stata descritta finora come un legame alle IgE. In ogni caso, anche la quantità di pomodoro GRP ritrovata sembra non essere influenzata dal trattamento Ni somministrato alle piante.

In conclusione, il Ni nel terreno può influenzare il profilo allergenico del pomodoro. Tuttavia, l'effetto sui singoli allergeni è diverso. Inoltre, si osserva l'influenza di altri fattori sulla presenza di allergeni, come la fase di maturazione e la cultivar peraltro già noti. Pertanto, il profilo allergenico del pomodoro che otteniamo è il risultato di una combinazione di diversi fattori. Riguardo alla presenza delle singole LTP 9k- e 7k nel frutto di pomodoro, non pare però che i trattamenti Ni alle concentrazioni utilizzate negli esperimenti del presente studio, siano correlati alla loro concentrazione. Allo stesso modo, anche il potenziale allergene della famiglia GRP sembra non essere influenzato dalla somministrazione di Ni300 alla pianta in fase di crescita. Diversamente invece i risultati suggeriscono che la quantità di TLP nei frutti di pomodoro può risentire della concentrazione di Ni somministrata alla pianta e presente nel pomodoro e varia anche in relazione diversa cultivar.

I dati ottenuti suggeriscono anche che, indipendentemente dalla somministrazione del Ni alla pianta e alla sua presenza nel frutto, si rileva una quantità complessivamente inferiore di Sola l 3 e anche di TLP, nel pomodoro acerbo di entrambe le cultivar. La presenza di Ni sembra anche essere associata anche a una diminuzione dei quantitativi dell'allergene Bet v 1, Sola l 4. Un effetto dose Ni dipendente si osserva sulla concentrazione di profilina, presente in quantitativi minori nei campioni trattati con Ni300. Questo effetto è più evidente nel pomodoro maturo.

Anche se il meccanismo non è ancora chiaro e necessitano senz'altro di ulteriori studi, la presenza di Ni sembra pertanto influire sulla fisiologia vegetale come suggerito anche dalla diminuzione di proteine come la profilina. Questa è una proteina tipica degli eucarioti, che ha un ruolo fondamentale nella crescita degli organismi, nello sviluppo, nella guarigione delle ferite e nella risposta immunitaria.

Pertanto, la diminuzione di questa proteina può causare squilibri nella fisiologia dell'organismo e non si può escludere che tali effetti anche se non sono stati evidenti nel presente studio, possano essere apprezzati in specifiche condizioni ambientali.

8. CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il pomodoro è un alimento importante nella dieta mediterranea ed una fonte notevole di antiossidanti, ma può presentare potenziali rischi per la salute umana in relazione alla presenza di metalli e allergeni. Questi aspetti sono da tenere in considerazione se si vuole produrre un alimento sicuro e fruibile anche per la parte di popolazione più sensibile ed intollerante/allergica.

Nel presente studio si è valutato in prima battuta come la coltivazione del pomodoro su un substrato ricco di Ni, nonché le diverse tecniche colturali su substrati a bassissime concentrazioni dello stesso metallo, possano influire sulla produttività complessiva in termini di germinazione, allungamento radicale, produzione di biomassa vegetativa nelle piante adulte e fruttificazione, nonché sulle concentrazioni rinvenibili di Ni nei frutti di pomodoro. Inoltre, sono stati verificati i potenziali allergenici dei suddetti frutti di pomodoro e le eventuali correlazioni con l'apporto di Ni alla pianta. Le cultivar di pomodoro del Gruppo Cuor di Bue prese in esame sono quelle che maggiormente vengono utilizzate in Liguria.

Il Ni è risultato fitotossico nelle cultivar considerate nelle prime fasi di germinazione ed allungamento radicale, con differenti livelli di sensibilità (maggiore nella 'Standard' rispetto alla 'Rugantino'). Le piante adulte invece risultano generalmente resistenti allo stress indotto da Ni presente nel suolo rispetto alla produzione di biomassa vegetativa. Si è osservata una generale resistenza al Ni a livello radicale per entrambe le cultivar. Considerando la biomassa fogliare si è osservata una maggior sensibilità della cultivar 'Ingrid' mentre considerando la biomassa epigea in generale (foglie e fusti) una maggior sensibilità della cultivar 'Standard'. Per quanto riguarda il raccolto, non si sono osservate variazioni in funzione del Ni in entrambe le cultivar, ma una maggiore concentrazione di Ni provoca una diminuzione del peso medio dei frutti maturi (rossi) della cultivar 'Standard'.

Le cultivar considerate mostrano una buona resistenza al Ni, se cresciute su substrato ricco di frazione organica, purché non presente in eccessive concentrazioni (Ni 300 mg/kg).

La concentrazione di Ni nei frutti che hanno raggiunto completo stadio di maturazione è risultata fortemente correlata ai livelli di Ni somministrato nel terreno, per entrambe le cultivar, confermando la tendenza di accumulo in tale specie.

Pertanto, le condizioni colturali, la tipologia di suolo nonché la scelta di cultivar sono di primaria importanza per limitare la mobilità del metallo dal suolo alla pianta, potendo ottenere in condizioni controllate un prodotto al commercio con livelli bassissimi di tale metallo, che può risultare di grande utilità ai soggetti con SNAS.

Per quanto riguarda le relazioni fra presenza di Ni nel frutto e potenziale allergenico, pur necessitando di ulteriori approfondimenti, i dati riscontrati *in vitro* fanno propendere per una diversa possibile associazione a seconda del tipo di proteina allergenica, che non sembra essere linearmente dose-dipendente Ni, ma che risulta comunque più ridotta per i pomodori coltivati su substrato a bassissimi livelli di Ni.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abeck, D., Traenckner, I., Steinkraus, V., Vieluf, D., Ring, J., 1993. Chronic urticaria due to nickel intake. *Acta Derm. Venereol.* 73, 438–439.
- Adams, S.R., Cockshull, K.E., Cave, C.R.J., 2001. Effect of temperature on the growth and development of tomato fruits. *Ann. Bot.* 88, 869–877.
- Albanese, S., Sadeghi, M., Lima, A., Cicchella, D., Dinelli, E., Valera, P., Falconi, M., Demetriades, A., De Vivo, B., 2015. GEMAS: Cobalt, Cr, Cu and Ni distribution in agricultural and grazing land soil of Europe. *J. Geochem. Explor., Continental, regional and local scale geochemical mapping* 154, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2015.01.004>
- Alves, S., Trancoso, M.A., Gonçalves, M. de L.S., dos Santos, M.M.C., 2011. A nickel availability study in serpentinised areas of Portugal. *Geoderma* 164, 155–163.
- American Academy of Dermatology, 2015. Position Statement on Nickel Sensitivity. <https://www.aad.org/forms/policies/uploads/ps/ps-nickel%20sensitivity.pdf> (accessed 12.12.17).
- Anke, M., Angelow, L., Gleis, M., Müller, M., Illing, H., 1995. The biological importance of nickel in the food chain. *Fresenius J. Anal. Chem.* 352, 92–96. <https://doi.org/10.1007/BF00322304>
- Antico, A., Soana, R., 1999. Chronic Allergic-Like Dermatopathies in Nickel-Sensitive Patients. Results of Dietary Restrictions and Challenge with Nickel Salts. *Allergy Asthma Proc. Provid.* 20, 235–42.
- Antibachi, D., Kelepertzis, E., Kelepertsis, A., 2012. Heavy Metals in Agricultural Soils of the Mouriki-Thiva Area (Central Greece) and Environmental Impact Implications. *Soil and Sediment Contamination* 21, 434–450.
- Asero, R., Antonicelli, L., Arena, A., Bommarito, L., Caruso, B., Colombo, G., Crivellaro, M., De Carli, M., Della Torre, E., Della Torre, F., 2009a. Causes of food-induced anaphylaxis in Italian adults: a multi-centre study. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 150, 271–277.
- Asero, R., Antonicelli, L., Arena, A., Bommarito, L., Caruso, B., Crivellaro, M., De Carli, M., Della Torre, E., Della Torre, F., Heffler, E., 2009b. EpidemAAITO: Features of food allergy in Italian adults attending allergy clinics: a multi-centre study. *Clin. Exp. Allergy* 39, 547–555.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., Amato, S., Caldironi, G., Barocci, F., Van Ree, R., 2002. Immunological cross-reactivity between lipid transfer proteins from botanically unrelated plant-derived foods: a clinical study. *Allergy* 57, 900–906.
- Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., de Vries, S.C., Gautier, M.-F., Ciurana, C.L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J.H., 2000. Lipid transfer protein: a pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122, 20–32.

- Asero, R., Piantanida, M., Pinter, E., Pravettoni, V., 2017. The clinical relevance of lipid transfer protein. *Clin. Exp. Allergy*. 48, 6-12.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K., Schuch, W., 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience* 35, 1013–1021.
- Cuomo, B., Bianchi, A., Atzeri, F., Brindisi, G., Ferrara, F., Romano, G., Verduci, E., Calvani, M., 2018. Lipid transfer protein. *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 2018 (4), 11-20
- Beecher, G.R., 1998. Nutrient content of tomatoes and tomato products. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218, 98–100.
- Bergougnoux, V., 2014. The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnol. Adv.* 32, 170–189.
- Bertin, N., 2005. Analysis of the Tomato Fruit Growth Response to Temperature and Plant Fruit Load in Relation to Cell Division, Cell Expansion and DNA Endoreduplication. *Ann. Bot.* 95, 439–447. <https://doi.org/10.1093/aob/mci042>
- Bianchini, G., Giuseppe, D.D., Natali, C., Beccaluva, L., 2013. Ophiolite Inheritance In The Po Plain Sediments: Insights On Heavy Metals Distribution And Risk Assessment. *Ofioliti* 38, 1–14. <https://doi.org/10.4454/ofioliti.v38i1.412>
- Bollard, E.G., 1983. Involvement of unusual elements in plant growth and nutrition. In: Lauchli, M.A., Bielecki, R.L., (edit.) *Inorganic Plant Nutrition*. *Encyclopedia of Plant Physiology*. New Ser. 15, 695-744.
- Borges, J.P., Barre, A., Culerrier, R., Granier, C., Didier, A., *et al.*, 2008. Lipid transfer proteins from Rosaceae fruits share consensus epitopes responsible for their IgE-binding cross-reactivity. *Biochem Biophys Res Commun* 365: 685–90.
- Bressy, F.C., Brito, G.B., Barbosa, I.S., Teixeira, L.S., Korn, M.G.A., 2013. Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP-MS following microwave-assisted digestion. *Microchem. J.* 109, 145–149.
- Brickell, C.D., Alexander, C., David, J.C., Hetterscheid, W.L.A., Leslie, A.C., Malécot, V., Xiaobai, J., 2009. *International Code of Nomenclature for Cultivated Plants*. [Scripta Horticulturae 10]. International Society for Horticultural Science. Leuven.
- Brooks, R. R. 1987. *Serpentine and its Vegetation: A Multidisciplinary Approach*. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Brown, P.H., Welch, R.M., Cary, E.E., 1987a. Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant Physiol.* 85, 801–803.
- Brown, P.H., Welch, R.M., Cary, E.E., Checkai, R.T., 1987b. Micronutrients: beneficial effects of nickel on plant growth. *J. Plant Nutr.* 10, 2125–2135.
- Brown, P.H., Welch, R.M., Madison, J.T., 1990. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. *Plant Soil* 125, 19–27.

- Burney, P., Summers, C., Chinn, S., Hooper, R., Van Ree, R., Lidholm, J., 2010. Prevalence and distribution of sensitization to foods in the European Community Respiratory Health Survey: a EuroPrevall analysis. *Allergy* 65, 1182–1188.
- CAAM (Centri Associati di Allergologia Molecolare), 2018. FABER, il test di screening per le allergie IgE-mediate: uno strumento preciso, completo, unico e potente. www.caam-allergy.com/it/faber
- Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., Stevens, P.F., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>
- Chen, C., Huang, D., Liu, J., 2009. Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *CLEAN–Soil Air Water* 37, 304–313.
- Ciardiello, M.A., Giangrieco, I., Tuppo, L., Tamburrini, M., Buccheri, M., Palazzo, P., Bernardi, M.L., Ferrara, R., Mari, A., 2009. Influence of the natural ripening stage, cold storage, and ethylene treatment on the protein and IgE-binding profiles of green and gold kiwi fruit extracts. *J Agric Food Chem* 57, 1565–1571.
- Cicchella, D., Giaccio, L., Dinelli, E., Albanese, S., Lima, A., Zuzolo, D., Valera, P., De Vivo, B., 2015. GEMAS: Spatial distribution of chemical elements in agricultural and grazing land soil of Italy. *J. Geochem. Explor.* 154, 129–142.
- Coleman, R.G., 2012. *Ophiolites: Ancient Oceanic Lithosphere?* Springer Science & Business Media.
- Coleman, R.G., Jove, C., 1992. Geological origin of serpentinites. in Baker, A. J. M., Proctor, J., Reeves, R. D., (eds), *The Vegetation of Ultramafic (Serpentine) Soils*: Andover, Intercept, p. 1–17.
- Committee for Medicinal Products for Human Use, C. for M.P. for H.U., 2008. Guideline on the specification limits for residues of metal catalysts or metal reagents. Lond. Eur. Med. Agency.
- Council Directive 86/278/EEC of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31986L0278&from=PL>. (accessed April 2018)
- Cunningham, E., 2017. What Role Does Diet Play in the Management of Nickel Allergy? *J. Acad. Nutr. Diet.* 117, 500.
- Dar, M.I., Khan, F.A., Green, I.D., Naikoo, M.I., 2015. The transfer and fate of Pb from sewage sludge amended soil in a multi-trophic food chain: a comparison with the labile elements Cd and Zn. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16133–16142. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4836-5>
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 Norme in materia ambientale pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2006 - suppl. ord. n. 96. <http://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/06152dl5.htm> (accessed dicembre 2019)

- Di Salvatore, M., Carafa, A.M., Carratù, G., 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two groStandardh substrates. *Chemosphere* 73, 1461–1464.
- Dixon, N.E., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B., 1975. Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4131–4133.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), 2015. Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of nickel in food and drinking water. *EFSA J.* 13. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4002>
- Egger, M., Hauser, M., Mari, A., Ferreira, F., Gadermaier, G., 2010. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 10, 326–335.
- El Hariri E., El-Bendary N., El Hassanien A., Badr A., 2015. Automated Ripeness Assessment System of Tomatoes Using PCA and SVM Techniques. In Sarfraz M. (edit.) *Computer Vision and Image Processing in Intelligent Systems and Multimedia Technologies*. IGI Global book series *Advances in Computational Intelligence and Robotics (ACIR)*: 101-130.
- Eskew, D.L., Welch, R.M., Cary, E.E., 1983. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possible all higher plants. *Science* 222, 621–624.
- Eskew, D.L., Welch, R.M., Norvell, W.A., 1984. Nickel in higher plants. *Plant Physiol.* 76, 691–693.
- ESSCA Writing Group, 2008. The European Surveillance System of Contact Allergies (ESSCA): results of patch testing the standard series, 2004. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22, 174–181. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02359.x>
- European Commission, s.d. . EU Plant Variety database . Vegetables varieties. http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_databases/search/public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=H&species_id=29&variety_name=&listed_in=8&show_current=on&show_deleted= (accessed 11.12.17).
- Eurostat 2016 http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/The_fruit_and_vegetable_sector_in_the_EU_-_a_statistical_overview
- Eurostat, 2016. Agriculture, forestry and fishery statistics. <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-statistical-books/-/KS-FK-16-001>
- Falagiani, P., Di Gioacchino, M., Ricciardi, L., Minciullo, P.L., Saitta, S., Carní, A., Santoro, G., Gangemi, S., Minelli, M., Bozzetti, M.P., 2008. Systemic nickel allergy syndrome (SNAS): A review. *Rev Port Imunoalergologia* 16, 135–147.
- FAO, <http://www.fao.org> [WWW Document], n.d.. Food Agric. Organ. U. N. URL <http://www.fao.org/home/en/> (accessed 11.19.17).
- FAOSTAT Database, 2013. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- FAOSTAT Database, 2014. <http://www.fao.org/faostat/en/#home>
- Fernández-Rivas, M., Bolhaar, S., González-Mancebo, E., Asero, R., van Leeuwen, A., Bohle, B., Ma, Y., Ebner, C., Rigby, N., Sancho, A.I., Miles, S., Zuidmeer, L., Knulst, A., Breiteneder, H.,

- Mills, C., Hoffmann-Sommergruber, K., van Ree, R., 2006. Apple allergy across Europe: how allergen sensitization profiles determine the clinical expression of allergies to plant foods. *J Allergy Clin Immunol* 118, 481-488.
- Fornasaro S., Comodim P., Crispini L., Malatesta C., Zucchini A., Marescotti P. (2019). Potentially toxic elements distribution in the serpentized and deformed ultramafic rocks from the Voltri Massif (NW, Italy). *Periodico di Mineralogia*, 88, 259-276.
- Ferreira F, Hawranek T, Gruber P, Wopfner N, Mari A (2004) Allergic crossreactivity: from gene to the clinic. *Allergy* 59, 243–67.
- Fontana, E., Nicola, S., Tibaldi, G., 2008. Tomato production systems and their application to the tropics, in: *International Symposium on Tomato in the Tropics* 821. pp., 27–34.
- Frieden, E., 2012. *Biochemistry of the essential ultratrace elements*. Springer Science & Business Media.
- Fullana-Pericàs M., Conesa M.À., Soler S., Ribas-Carbó M., Granell A., Galmés, 2017. Variations of leaf morphology, photosynthetic traits and water-use efficiency in Western-Mediterranean tomato landraces. *Photosynthetica* 55, 121-133.
- Gad, N., El-Sherif, M.H., El-Gereedly, N.H.M., 2007. Influence of nickel on some physiological aspects of tomato plants. *Aust. J Basic Appl Sci* 1, 286–293.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Slaba, M., Mazur, J., 2006. Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biol. Plant.* 50, 653–659.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., 2007. Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals* 20, 27–36.
- Gajewska, E., Wielanek, M., Bergier, K., Skłodowska, M., 2009. Nickel-induced depression of nitrogen assimilation in wheat roots. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1291. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0370-8>
- Garg, S., Thyssen, J.P., Uter, W., Schnuch, A., Johansen, J.D., Menné, T., Belloni Fortina, A., Statham, B., Gawkrödger, D.J., 2013. Nickel allergy following European Union regulation in Denmark, Germany, Italy and the U.K. *Br. J. Dermatol.* 169, 854–858. <https://doi.org/10.1111/bjd.12556>
- Georgiadou, E.C., Kowalska, E., Patla, K., Kulbat, K., Smolińska, B., Leszczyńska, J., Fotopoulos, V., 2018. Influence of Heavy Metals (Ni, Cu, and Zn) on Nitro-Oxidative Stress Responses, Proteome Regulation and Allergen Production in Basil (*Ocimum basilicum* L.) Plants. *Frontiers in Plant Science* 9, 862.
- Ghaderian, S.M., Mohtadi, A., Rahiminejad, R., Reeves, R.D., Baker, A.J.M., 2007. Hyperaccumulation of nickel by two *Alyssum* species from the serpentine soils of Iran. *Plant Soil* 293, 91–97.
- Giangrieco, I., Alessandri, C., Rafaiani, C., Santoro, M., Zuzzi, S., Tuppo, L., Tamburrini, M., D'Avino, R., Ciardiello, M.A., Mari, A., 2015. Structural features, IgE binding and

- preliminary clinical findings of the 7kDa Lipid Transfer Protein from tomato seeds. *Mol Immunol* 66, 154-163.
- Giangrieco, I., Ricciardi, T., Alessandri, C., Farina, L., Crescenzo, R., Tuppo, L., Ciancamerla, M., Rafaiani, C., Bernardi, M.L., Digilio, A.F., Cobucci-Ponzano, B., Tamburrini, M., Mari, A., Ciardiello, M.A., 2019. ENEA, a peach and apricot IgE-binding protein cross-reacting with the latex major allergen Hev b 5. *Mol Immunol* 112, 347-357.
- Giménez-Arnau, A., Riambau, V., Serra-Baldrich, E., Camarasa, J.G., 2000. Metal-induced generalized pruriginous dermatitis and endovascular surgery. *Contact Dermatitis* 43, 35-40. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2000.043001035.x>
- Giovannucci, E., 1999. Tomatoes, Tomato-Based Products, Lycopene, and Cancer: Review of the Epidemiologic Literature. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 91, 317-331. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.4.317>
- Gopal, R., 2014. Excess nickel modulates oxidative stress responsive enzymes in groundnut. *J. Plant Nutr.* 37, 1433-1440.
- Harrison, S., Rajakaruna, N., 2011. *Serpentine: The Evolution and Ecology of a Model System*. University of California Press.
- Hauser, M., Roulias, A., Ferreira, F., Egger, M., 2010. Panallergens and their impact on the allergic patient. *Allergy Asthma Clin. Immunol* 6: 1-14.
- Hernandez-Soriano, M.C., Jimenez-Lopez, J.C., 2012. Effects of soil water content and organic matter addition on the speciation and bioavailability of heavy metals. *Sci. Total Environ.* 423, 55-61.
- Hindsén, M., Bruze, M., Christensen, O.B., 2001. Flare-up reactions after oral challenge with nickel in relation to challenge dose and intensity and time of previous patch test reactions. *J. Am. Acad. Dermatol.* 44, 616-623. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.110873>
- Inomata, N., Miyakawa, M., Aihara, M., 2017. Gibberellin-regulated protein in Japanese apricot is an allergen cross-reactive to Pru p 7. *Immunity, Inflammation and Disease* 5, 469-479.
- Inomata, N., Miyakawa, M., Ikeda, N., Oda, K., Aihara, M., 2018. Identification of gibberellin-regulated protein as a new allergen in orange allergy. *Clin Exp Allergy* 48, 1509-1520..
- ISO 11269-1:2012 - Soil quality -- Determination of the effects of pollutants on soil flora -- Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth [WWW Document], n.d. URL <https://www.iso.org/standard/51388.html> (accessed 11.12.17).
- Istat, 2017. *Coltivazioni : Ortive - dati Istat*. <http://dati.istat.it/Index.aspx?QueryId=33703#>
- Jensen, C.S., Menné, T., Lisby, S., Kristiansen, J., Veien, N.K., 2003. Experimental systemic contact dermatitis from nickel: a dose-response study. *Contact Dermatitis* 49, 124-132.
- Johansson, S.G.O., Bieber, T., Dahl, R., Friedmann, P.S., Lanier, B.Q., *et al.* Lanier, B.Q., Lockey, R.F., Motala, C., Ortega Martell, J.A., Platts-Mills, T.A.E., Ring, J., Thien, F., Van Cauwenberge, P.,

- Williams, H.C., 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 113, 832–836.
- Kelepertzis, E., Stathopoulou, E., 2013. Availability of geogenic heavy metals in soils of Thiva town (central Greece). *Environ. Monit. Assess.* 185, 9603–9618.
- Kabata-Pendias, A., 2011. *Trace Elements in Soils and Plants*, 3rd edn, CRC, Boca Raton, 2011, pp. 505
- Khalid, B.Y., Tinsley, J., 1980. Some effects of nickel toxicity on rye grass. *Plant Soil* 55, 139–144.
- Kierczak, J., Neel, C., Bril, H., Puziewicz, J., 2007. Effect of mineralogy and pedoclimatic variations on Ni and Cr distribution in serpentine soils under temperate climate. *Geoderma* 142, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2007.08.009>
- Kopittke, P.M., Asher, C.J., Menzies, N.W., 2007. Toxic effects of Ni²⁺ on groStandardh of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Soil* 292, 283–289.
- Kozlov, M.V., 2005. Pollution resistance of mountain birch, *Betula pubescens* subsp. *czerepanovii*, near the copper–nickel smelter: natural selection or phenotypic acclimation? *Chemosphere* 59, 189–197.
- Krob, H.A., Fleischer, A.B., D'Agostino, R., Haverstock, C.L., Feldman, S., 2004. Prevalence and relevance of contact dermatitis allergens: A meta-analysis of 15 years of published T.R.U.E. test data. *J. Am. Acad. Dermatol.* 51, 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.11.069>
- Kumar, P., Roupael, Y., Cardarelli, M., Colla, G., 2015. Effect of nickel and grafting combination on yield, fruit quality, antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation, and mineral composition of tomato. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 848–860.
- Kumar, P., Roupael, Y., Cardarelli, M., Colla, G., 2015. Effect of nickel and grafting combination on yield, fruit quality, antioxidative enzyme activities, lipid peroxidation, and mineral composition of tomato. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 178, 848–860.
- Küpper, H., Lombi, E., Zhao, F.-J., Wieshammer, G., McGrath, S.P., 2001. Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. *J. Exp. Bot.* 52, 2291–2300.
- L'Huillier, L., d'Auzac, J., Durand, M., Michaud-Ferrière, N., 1996. Nickel effects on two maize (*Zea mays*) cultivars: groStandardh, structure, Ni concentration, and localization. *Can. J. Bot.* 74, 1547–1554.
- Li, B., Zhang, H., Ma, Y., McLaughlin, M.J., 2013. Relationships between soil properties and toxicity of copper and nickel to bok choy and tomato in Chinese soils. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2372–2378. <https://doi.org/10.1002/etc.2312>
- Liu, X., Song, Q., Tang, Y., Li, W., Xu, J., Wu, J., Wang, F., Brookes, P.C., 2013. Human health risk assessment of heavy metals in soil–vegetable system: A multi-medium analysis. *Sci. Total Environ.* 463–464, 530–540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.064>

- Mahdi, G., Israel, D.M., Hassall, E., 1996. Nickel dermatitis and associated gastritis after coin ingestion. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 23, 74–76.
- Marescotti, P., Comodi, P., Crispini, L., Gigli, L., Zucchini, A., Fornasaro, S., 2019. Potentially Toxic Elements in Ultramafic Soils: A Study from Metamorphic Ophiolites of the Voltri Massif (Western Alps, Italy). *Minerals*, 9, 1-23, ISSN: 2075-163X, doi: 10.3390/min9080502.
- Mari, A., Alessandri, C., Bernardi, M.L., Ferrara, R., Scala, E., Zennari, D., 2010. Microarrayed Allergen Molecules for the Diagnosis of Allergic Diseases. *Curr Allergy Asthma Rep* 10: 357–64.
- Mari, A., Rasi, C., Palazzo, P., Scala, E., 2009. Allergen databases: current status and perspectives. *Curr Allergy Asthma Rep* 9: 376–83.
- Marmioli, N., Maestri, E., 2008. Health Implications of Trace Elements in the Environment and the Food Chain. In: Prasad, M.N.V. (edit.), *Trace elements as contaminants and nutrients. Consequences in Ecosystems and Human Health*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 23-53.
- Massoura, S.T., Echevarria, G., Becquer, T., Ghanbaja, J., Leclerc-Cessac, E., Morel, J.-L., 2006. Control of nickel availability by nickel bearing minerals in natural and anthropogenic soils. *Geoderma* 136, 28–37.
- Mattioli, P.A., 1554. 1554, Petri Andreae Matthioli Medici Senensis Commentarii, in *Libros sex Pedacii Dioscoridis Anazarbei, de Materia Medica, Adjectis quàm plurimis plantarum & animalium imaginibus, eodem authore, detti Commentarii. Libr. Sex Pedacii Dioscoridis Anazarbei Medica Mater. Off. Erasmiana Vincentium Valgrisiium Venetijs*.
- Menné, T., Veien, N.K., 2001. Systemic Contact Dermatitis, in: *Textbook of Contact Dermatitis*. Springer, Berlin, Heidelberg, 355–366.
- Migliori, C.A., Salvati, L., Di Cesare, L.F., Scalzo, R.L., Parisi, M., 2017. Effects of preharvest applications of natural antimicrobial products on tomato fruit decay and quality during long-term storage. *Sci. Hortic.* 222, 193–202.
- Minale, P., Bignardi, D., Troise, C., Voltolini, S., Dignetti, P. 2016. A regional approach to unmet needs in anaphylaxis. *Allergy Clin Immunol* 48, 88-93.
- Ministero della Salute, 2007. Progetto Mattoni SSN. Pronto Soccorso e Sistema 118. Proposta metodologica per la valutazione dei costi dell'emergenza. http://www.mattoni.salute.gov.it/mattoni/documenti/11_Valutazione_costi_dell_emergenza.pdf
- MIPAAF (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali), 2020. Ventesima revisione dell'elenco dei prodotti agroalimentari tradizionali (S.O. n. 176 del 29 luglio 2017) <https://www.politicheagricole.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/15132> (accessed March2020)

- Mizuno, N., 1968. Interaction between iron and nickel and copper and nickel in various plant species. *Nature* 219, 1271–1272.
- Molas, J., 2002. Changes of chloroplast ultrastructure and total chlorophyll concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. *Environ. Exp. Bot.* 47, 115–126.
- Mustatea, G., Iorga, E., Belc, N., Ionescu, V., Ionescu, M., 2016. Analysis of potential carcinogenic heavy metals in fruits and vegetables with impact on the markets of Bucharest-Ilfov region. *J. Hyg. Eng. Des.* 17, 11–17.
- Nguyen, S.H., Dang, T.P., MacPherson, C., Maibach, H., Maibach, H.I., 2008. Prevalence of patch test results from 1970 to 2002 in a multi-centre population in North America (NACDG). *Contact Dermatitis* 58, 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2007.01281.x>
- Nielsen, F.H., Ollerich, D.A., 1974. Nickel: A new essential trace element, in: *Fed. Proc.*, 33, 1767–1772.
- Nieminen, T.M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N., Shotyk, W., 2007. Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Met. Ions Life Sci.* 2, 1–30.
- Nieminen, T.M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N., Shotyk, W. 2007. Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. In: "Metal ions in life sciences, Vol. 2 - Nickel and its surprising impact in nature". John Wiley & Sons Ltd., Chichester (England), 702 pp.
- Nziguheba, G., Smolders, E., 2008. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *Sci. Total Environ.* 390, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.09.031>
- OECD, 2017. Safety Assessment of Transgenic Organisms in the Environment, Volume 7: OECD Consensus Documents, Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. Chapter 2. Tomato (*Solanum lycopersicum*), pp. 69–106. OECD Publishing, Paris. <http://dx.doi.org/10.1787/9789264279728-en>
- OECD, 2008. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals - Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, 2006.
- Otten, J.J., Hellwig, J.P., Meyers, L.D. (Edits), 2006. Dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements. National Academies Press.
- Palacios, G., Gomez, I., Carbonell-Barrachina, A., Pedreño, J.N., Mataix, J., 1998. Effect of nickel concentration on tomato plant nutrition and dry matter yield. *J. Plant Nutr.* 21, 2179–2191.
- Palazzo, P., Tuppo, L., Giangrieco, I., Bernardi, M.L., Rafaiani, C., Crescenzo, R., Tamburrini, M., Zuzzi, S., Alessandri, C., Mari, A., Ciardiello, M.A., 2013. Prevalence and peculiarities of IgE reactivity to kiwifruit pectin methylesterase and its inhibitor, Act d 7 and Act d 6, in subjects allergic to kiwifruit. *Food Research International* 53, 24–30.
- Pandey, N., Sharma, C.P., 2002. Effect of heavy metals Co 2+, Ni 2+ and Cd 2+ on groStandardh and metabolism of cabbage. *Plant Sci.* 163, 753–758.

- Papadaki, A.M., Bletsos, F.A., Eleftherohorinos, I.G., Menexes, G., Lagopodi, A.L., 2017. Effectiveness of seven commercial rootstocks against verticillium wilt and their effects on growth, yield, and fruit quality of tomato. *Crop Prot.* 102, 25–31.
- Pasquariello, M.S., Palazzo, P., Tuppo, L., Liso, M., Petriccione, M., Rega, P., Tartaglia, A., Tamburrini, M., Alessandri, C., Ciardiello, M.A., Mari, A., 2012. Analysis of the potential allergenicity of traditional apple cultivars by Multiplex Biochip-Based Immunoassay. *Food Chemistry* 135, 219–227.
- Picarelli, A., Di Tola, M., Vallecoccia, A., Libanori, V., Magrelli, M., Carlesimo, M., Rossi, A., 2011. Oral mucosa patch test: a new tool to recognize and study the adverse effects of dietary nickel exposure. *Biol. Trace Elem. Res.* 139, 151–159.
- Pinto, E., Aguiar, A.A., Ferreira, I.M., 2014. Influence of soil chemistry and plant physiology in the phytoremediation of Cu, Mn, and Zn. *Crit. Rev. Plant Sci.* 33, 351–373.
- Pignatti S., 2018. *Flora d'Italia. Seconda Edizione. Vol. 3.* p. 509. Edagricole, Bologna.
- Pinto, E., Almeida, A.A., Ferreira, I.M., 2015. Assessment of metal(loid)s phytoavailability in intensive agricultural soils by the application of single extractions to rhizosphere soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 418–424.
- Pizzutelli, S., 2011. Systemic nickel hypersensitivity and diet: myth or reality? *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* 43, 5.
- Pollard, A.J., Powell, K.D., Harper, F.A., Smith, J.A.C., 2002. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 539–566.
- Poulik, Z., 1999. Influence of nickel contaminated soils on lettuce and tomatoes. *Sci. Hortic.* 81, 243–250. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(99\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(99)00023-0)
- Pozzatti, M., Nakadi, F.V., Vale, M.G.R., Welz, B., 2017. Simultaneous determination of nickel and iron in vegetables of Solanaceae family using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Microchem. J.* 133, 162–167.
- Pravettoni, V., Primavesi, L., Farioli, L., Brenna, O.V., Pompei, C., Conti, A., Scibilia, J., Piantanida, M., Mascheri, A., Pastorello, E.A., 2009. Tomato allergy: detection of IgE-binding lipid transfer proteins in tomato derivatives and in fresh tomato peel, pulp, and seeds. *J. Agric. Food Chem.* 57, 10749–10754.
- Prescott S, Allen KJ (2011) Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatr Allergy Immunol* 22, 155–60.
- Pucci, N., Asero, R., Calvani, M., Indirli, G.C., La Grutta, S., 2011. La diagnosi di allergia alle profiline *Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica* 2011(6), 3-15
- Quantin, C., Ettler, V., Garnier, J., Šebek, O., 2008. Sources and extractibility of chromium and nickel in soil profiles developed on Czech serpentinites. *Comptes Rendus Geosci.* 340, 872–882.

- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H., 2008. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 121, 847-852.e7.
- Radauer, C., Bublin, M., Wagner, S., Mari, A., Breiteneder, H., 2008. Allergens are distributed into few protein families and possess a restricted number of biochemical functions. *J Allergy Clin Immunol* 121: 847-52.
- Rajapaksha, A.U., Vithanage, M., Oze, C., Bandara, W., Weerasooriya, R., 2012. Nickel and manganese release in serpentine soil from the Ussangoda Ultramafic Complex, Sri Lanka. *Geoderma* 189, 1-9.
- Redazione Tecnica Ospedaliera, 2017. Nuove test per diagnosticare le allergie <https://www.tecnicaospedaliera.it/test-diagnosticare-le-allergie/> (accessed ottobre 2017)
- Rehman, F., Khan, F., Irfan, M., Dar, M., Naushin, F., 2016. Impact of Nickel on the growth of *Lycopersicon esculentum* var. Navodaya. *Int. J. Environ. Sci.* 7, 100-106.
- Regione Liguria, 2015. Deliberazione della Giunta Regionale n. 332, 20.03.2015. Indirizzi regionali per le imprese alimentari e le AA.SS. LL inerenti la produzione/somministrazione/vendita di alimenti non confezionati contenenti allergeni o privi degli stessi e/o senza glutine. Bollettino Ufficiale della Regione Liguria, Anno XLVI, n. 15, Parte II, 44-59.
- Reimann, C., Caritat, P. de, 2012. Chemical Elements in the Environment: Factsheets for the Geochemist and Environmental Scientist. Springer Science & Business Media.
- Ricciardi, L., Arena, A., Arena, E., Zambito, M., Ingrassia, A., Valenti, G., Loschiavo, G., D'Angelo, A., Saitta, S., 2014. Systemic Nickel Allergy Syndrome: Epidemiological Data from Four Italian Allergy Units. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 27, 131-136. <https://doi.org/10.1177/039463201402700118>
- Riccioni, G., 2009. Carotenoids and cardiovascular disease. *Curr. Atheroscler. Rep.* 11, 434-439.
- Roccoliello, E., Serrano, H.C., Mariotti, M.G., Branquinho, C., 2016. The impact of Ni on the physiology of a Mediterranean Ni-hyperaccumulating plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 12414-12422. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6461-3>
- Uter, et al. 2016 Contact Dermatitis, 75, 111-128
- Rodriguez-Iruretagoiena, A., Trebolazabala, J., Martinez-Arkarazo, I., de Diego, A., Madariaga, J.M., 2015. Metals and metalloids in fruits of tomatoes (*Solanum lycopersicum*) and their cultivation soils in the Basque Country : Concentrations and accumulation trends. *Food Chem.* 173, 1083-1089. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.133>
- Romano, A., Scala, E., Rumi, G., Gaeta, F., Caruso, C., Alonzi, C., Maggioletti, M., Ferrara, R., Palazzo, P., Palmieri, V., Zeppilli, P., Mari, A., 2012. Lipid transfer proteins: the most frequent sensitizer in Italian subjects with food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy* 42, 1643-1653.

- Salim M.M.R., Rashid M.H., Hossain M.M., Zakaria M., 2018. Morphological characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) genotypes. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences (in press). <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2018.11.001>
- Salminen, T.A., Blomqvist, K., Edqvist, J., 2016. Lipid transfer proteins: classification, nomenclature, structure, and function. *Planta* 244, 971–997.
- Scala, E., Alessandri, C., Bernardi, M.L., Ferrara, R., Palazzo, P., *et al.* 2010. Cross sectional survey on immunoglobulin E reactivity in 23 077 subjects using an allergenic molecule-based microarray detection system. *Clin Exp Allergy* 40, 911–921.
- Ščančar, J., Zuliani, T., Milačič, R., 2013. Study of nickel content in Ni-rich food products in Slovenia. *J. Food Compos. Anal.* 32, 83–89.
- Schiavino, D., Nucera, E., Alonzi, C., Buonomo, A., Pollastrini, E., Roncallo, C., De Pasquale, T., Lombardo, C., La Torre, G., Sabato, V., 2006. A clinical trial of oral hyposensitization in systemic allergy to nickel. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 19, 593–600.
- Seregin, I.V., Kozhevnikova, A.D., 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 53, 257–277.
- Sharma, A.D., 2007. Relationship between nickel allergy and diet. *Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.* 73, 307. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.35733>
- Shekar, C.C., Sammaiah, D., Rambabu, M., Reddy, K.J., 2017. Effect of cadmium on tomato groStandardh and yield attributes. *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 1, 109–112.
- Sheoran, I.S., Singal, H.R., Singh, R., 1990. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynth. Res.* 23, 345–351. <https://doi.org/10.1007/BF00034865>
- Singh, S., Singh, A., Bahadur, R., 2011. Effect of cadmium on germination and seedling growth of tomato (*Lycopersicon esculentum*-Mill). *Plant Arch.* 11, 859–862.
- Sirisomboon, P., Tanaka, M., Kojima, T., 2012. Evaluation of tomato textural mechanical properties. *J. Food Engineering* 111, 618–624.
- Taharn, N., Techawongstein, S., Chanthai, S., 2014. Determination of major-to-trace elements in hot chilli and tomato varieties economically grown in the Northeast of Thailand by ICP-OES following microwave assisted digestion. *Int. Food Res. J.* 21, 517–522
- Torres, F., das Graças, M., Melo, M., Tosti, A., 2009. Management of contact dermatitis due to nickel allergy: an update. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol. CCID* 2, 39–48.
- Tuppo, L., Giangrieco, I., Alessandri, C., Ricciardi, T., Rafaiani, C., Ciancamerla, M., Ferrara, R., Zennaro, D., Bernardi, M.L., Tamburrini, M., Mari, A., Ciardiello, M.A., 2018. Pomegranate chitinase III: Identification of a new allergen and analysis of sensitization patterns to chitinases. *Mol Immunol* 103, 89–95.

- Turi, M.C., Di Claudio, F., Schiavone, C., Verna, N., Perrone, A., Cavallucci, E., Di Gioacchino, M., 2008. Systemic nickel allergy syndrome: an update. *It J Allergy Clin Immunol* 18, 98–102.
- Underwood, E., 2012. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Elsevier.
- USDA, Food Composition Databases [WWW Document], 2016. <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3223> (accessed 1.5.18).
- Uter, W., Larese Filon, F., Rui, F., Balato, A., Wilkinson, M., Krecisz, B., Chomiczewska-Skora, D., Kiec-Swierczynska, M., Schuttelaar, M.A., Frosch, P.J., Bircher, A.J., 2016. ESSCA results with nickel, cobalt and chromium, 2009–2012. *Contact Dermatitis*, 75, 111-128.
- Valenta, R., Duchene, M., Ebner, C., Valent, P., Sillaber, C., Deviller, P., Ferreira, F., Tejkl, M., Edelmann, H., Kraft, D., Scheiner, O., 1992. Profilins constitute a novel family of functional plant pan-allergen. *J Exp Med* 175, 377-85.
- Valenta, R., Duchêne, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., Scheiner, O., 1991. Identification of profilin as a novel pollen allergen; IgE autoreactivity in sensitized individuals. *Science* 1991; 253:557-60.
- Valenta, R., Ferreira, F., Grote, M., Swoboda, I., Vrtal, S., Duchgnes, M., Deviller, P., Meagher, R.B., McKinney, E., Heberle-Bors, E., Kraft, D., Scheiner, O., 1993. Identification of profilin as an actin-binding protein in higher plants. *J Biol Chem* 268, 22777-22781.
- Van Hyfte, A. (edit.), 2015. European Union Environmental Risk Assessment of Nickel. Fact Sheet 7. Arcadis, Nickel Institute & NiPERA. 8 pp. <https://nickelinstitute.org/science/environmental-science-fact-sheets/fact-sheet-7-diffuse-emissions/> (accessed december 2019)
- Watanabe, Y., Shimada, N., 1990. Effect of nickel on the plant growth and urea assimilation in higher plants., in: *Transactions 14th International Congress of Soil Science, Kyoto, Japan, August 1990*, IV, 146–151.
- Westphal, S., Kolarich, D., Foetisch, K., Lauer, I., Altmann, F., Conti, A., Crespo, J.F., Rodríguez, J., Enrique, E., Vieths, S., Scheurer, S., 2003. Molecular characterization and allergenic activity of Lyc e 2 (β -fructofuranosidase), a glycosylated allergen of tomato. *European Journal of Biochemistry* 270, 1327-1337.
- Yang, X., Baligar, V.C., Martens, D.C., Clark, R.B., 1996. Plant tolerance to nickel toxicity: II Nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *J. Plant Nutr.* 19, 265–279.
- Yeats, T.H., Rose, J.K., 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci* 17, 191–198.
- Zirwas, M.J., Molenda, M.A., 2009. Dietary nickel as a cause of systemic contact dermatitis. *J. Clin. Aesthetic Dermatol.* 2, 39-45